

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etudes des profils d'expression génique de cellules monocytaires THP-1 en conditions pro-inflammatoires et pro-athérogènes

Suin, Vanessa

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etudes des profils d'expression génique de cellules monocytaires THP-1 en
conditions pro-inflammatoires et pro-athérogènes.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Vanessa Suin

Juin 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Études des profils d'expression génique de cellules monocytaires THP-1 en conditions pro-inflammatoires et pro-athérogènes

SUIN Vanessa

Résumé

L'athérosclérose, responsable de plus de 50 % des décès dans le monde occidental, est une maladie caractérisée par un épaississement local de la paroi vasculaire. Les étapes précoces de cette pathologie font intervenir plusieurs acteurs cellulaires parmi lesquels le monocyte joue un rôle majeur. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude des profils d'expression génique de cellules monocytaires THP-1, au niveau ARNm, en conditions pro-inflammatoires et pro-athérogènes. L'outil principal utilisé est la GeneralChip (EAT), damier permettant de suivre l'expression de plus de 200 gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires. Les ADNc provenant d'une transcription inverse d'ARNm extrait de monocytes stimulés ou non avec le LPS et le PMA, comme système de référence, et avec les LDL - la condition pro-athérogène choisie - sont hybridés sur le damier. Pour le LPS (pro-inflammatoire) et le PMA (provoquant la différenciation du monocyte en macrophage), nous retrouvons les profils d'expression génique attendus, ce qui valide la technique sur notre modèle. La stimulation avec les LDL reflète, quant à elle, une prédisposition des monocytes à traverser la barrière endothéliale avec une surexpression de gènes tels que les métalloprotéinases ou encore le récepteur à l'urokinase, impliqué dans le chimiotactisme des cellules leucocytaires. Les résultats obtenus sur le damier à ADN ont, ensuite, été confirmés par la technique de PCR en temps réel. Cette étude sera, par la suite, complétée par des analyses d'expression génique des THP-1 sur des damiers à haute densité. Les résultats de ces études devront permettre de mieux préciser le rôle des monocytes dans les étapes précoces de l'athérogenèse et de voir dans quelle mesure les LDL affectent négativement les monocytes dans ce contexte.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2002

Promoteur : M. Raes

Voici la fin de mes quatre années de biologie remplies de surprises , de découvertes et bien évidemment d'études ! Au terme de ce travail, je voudrais remercier l'ensemble des personnes ayant contribué à la réussite de ce mémoire.

Je remercie tout d'abord le Professeur Martine Raes de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire mais aussi pour la lecture de ce mémoire et son regard critique. Je la remercie également pour son dynamisme quotidien.

Je remercie bien sûr Sofia pour son apprentissage, ses conseils, sa patience et le temps passé à la correction de ce travail tout au long de ces quatre mois.

Merci à Isabelle, Sofie ainsi qu'aux autres chercheurs de EAT pour les damiers à ADN.

Merci aussi à Martine Martin pour sa gentillesse ainsi qu'à l'équipe d'athéro pour leurs nombreux conseils tout au long de ce mémoire.

Merci à Marc pour son dévouement à régler pour tous les plantages d'ordi !

Je tiens également à remercier mes parents de m'avoir permis de faire des études et de m'avoir soutenue pendant toutes ces années.

Et évidemment, merci à Caro, Cindy (pour les délires de 17 h), Emma (pour sa fonction de secrétaire...), Del, Vi et Marion pour leur aide et leur soutien et tous les bons moments passés ensemble. En espérant que ceux-ci continuent encore longtemps.

Merci aussi à Caro (poulette) de m'avoir aidée à terminer ce travail dans « la » dernière nuit...

Merci à toi, Martin, pour tes encouragements, ton aide, ta patience dans les jours plus difficiles mais aussi de m'avoir soutenue tout au long de ce mémoire.

| | |
|---|----------|
| <u>INTRODUCTION :</u> | 1 |
| I. INTRODUCTION GÉNÉRALE : | 1 |
| II. L'ATHÉROSCLÉROSE : | 1 |
| 1. STRUCTURE D'UNE ARTÈRE : | 1 |
| 2. FACTEURS DE RISQUE : | 2 |
| 3. HYPOTHÈSE DE LA RÉACTION À L'AGRESSION : | 3 |
| III. LES LIPOPROTÉINES ET LEUR RÔLE DANS L'ATHÉROSCLÉROSE : | 4 |
| 1. STRUCTURE DES LIPOPROTÉINES : | 4 |
| 2. MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES : | 4 |
| 3. RÔLES DES LIPOPROTÉINES DANS L'ATHÉROSCLÉROSE : | 5 |
| 4. LES RÉCEPTEURS DES LIPOPROTÉINES : | 7 |
| a) Les récepteurs aux LDL natives : | 7 |
| b) Les récepteurs aux LDL modifiées : | 7 |
| IV. LES MONOCYTES-MACROPHAGES : | 8 |
| 1. DANS LE CONTEXTE DE L'ATHÉROSCLÉROSE : | 8 |
| 2. ACTIVATION PAR LE LPS : | 10 |
| V. L'ÉTUDE DES PROFILS D'EXPRESSION GÉNIQUE : | 12 |
| 1. NORTHERN BLOT : | 12 |
| 2. DIFFERENTIAL DISPLAY : | 12 |
| 3. LES MICRODAMIERS À ADN : | 13 |
| 4. LA PCR EN TEMPS RÉEL : | 14 |
| VI. OBJECTIFS DU MÉMOIRE : | 15 |

MATERIELS ET METHODES : 17

| | |
|------------------------------------|----|
| I. CULTURE CELLULAIRE : | 17 |
| 1) Matériels : | 17 |
| 2) Méthode : | 17 |
| II. EXTRACTION DE LIPOPROTÉINES : | 18 |
| 1) Principe : | 18 |
| 2) Matériels : | 18 |
| 3) Méthode : | 18 |
| <u>Dosage des LDL :</u> | 19 |
| 1) Matériel : | 19 |
| 2) Méthode : | 19 |
| III. TEST DE CHÉMOTACTISME : | 19 |
| 1) Principe : | 19 |
| 2) Matériels : | 20 |
| 3) Méthode : | 20 |
| IV. ÉTUDES D'EXPRESSION DE GÈNES : | 21 |
| 1. STIMULATION DES THP-1 : | 21 |
| 1) Principe : | 21 |

| | |
|--|----|
| 2) Matériels : | 21 |
| 3) Méthode : | 21 |
| 2. EXTRACTION D'ARNM : | 21 |
| 1) Principe : | 21 |
| 2) Matériels : | 22 |
| 3) Méthode : (selon les instructions du fournisseur) : | 22 |
| 3. TRANSCRIPTION INVERSE : | 23 |
| 1) Principe : | 23 |
| 2) Matériels : | 23 |
| 3) Méthode : | 24 |
| 4. DAMIERS À ADN : | 24 |
| 4.1 Hybridation des ADNc biotinylés : | |
| 1) Principe : | 24 |
| 2) Matériel : | 24 |
| 3) Méthode : | 24 |
| 4.2 Révélation des ADNc : | |
| 1) Principe : | 25 |
| 2) Matériels : | 25 |
| 3) Méthode : | 25 |
| 5. REAL-TIME PCR : | 26 |
| 1) Principe : | 26 |
| 2) Matériels : | 26 |
| 3) Méthode : | 26 |
| 1. Mise au point des concentrations d'amorces en Real-Time PCR : | 26 |
| 2. Comparaison des efficacités de PCR : | 27 |
| 3. Real-Time PCR : | 27 |
| 6. TRANSFECTION DES THP-1 PAR ÉLECTROPORATION : | 28 |
| 1) Principe : | 28 |
| 2) Matériels : | 28 |
| 3) Méthodes : | 28 |
| 1. Optimisation des programmes de nucléofection : | 28 |
| 2. Test de cytotoxicité : | 29 |
| 3. Optimisation de la transfection : | 29 |
| 4. Optimisation du programme U01 : | 29 |

RESULTATS ET DISCUSSION :30

I. EXTRACTION DES LDL ET BIOACTIVITÉ : 30

| | |
|-------------------------|----|
| 1. EXTRACTION DES LDL : | 30 |
| 2. LE CHÉMOTACTISME : | 31 |

II. ÉTUDE DES PROFILS D'EXPRESSION GÉNÉRIQUE SUR DAMIERS À ADN: 32

| | |
|---|----|
| 1. LA STIMULATION DES CELLULES THP-1 : | 32 |
| 2. L'EXTRACTION D'ARNM ET LA TRANSCRIPTION INVERSE : | 32 |
| 3. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES DAMIERS À ADN UTILISÉS : | 34 |
| 3.1 Hybridation, Révélation et Quantification : | 34 |
| 3.2 Difficultés rencontrées : | 35 |
| 3.3 Résultats obtenus avec les différents damiers: | 36 |
| 3.3.1 Damier prototype : | 36 |
| 3.3.2 Le CD Généraliste : | 37 |
| 3.3.3 La GeneralChip : | 39 |
| 3.3.4 Discussion des résultats d'hybridation : | 44 |

| | |
|---|----|
| III. CONFIRMATION DES RÉSULTATS OBTENUS SUR DAMIERS AVEC LA PCR EN TEMPS RÉEL : | 50 |
| 1. RÉSULTATS : | 50 |
| 2. DISCUSSION : | 55 |
| IV. LA TRANSFECTION : | 55 |
| 1. INTRODUCTION : | 55 |
| 2. RÉSULTATS : | 55 |
| 3. DISCUSSION : | 59 |
| <u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES :</u> | 60 |
| <u>ANNEXES :</u> | 62 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE :</u> | 67 |

Liste des abréviations :

| | |
|--------------|---|
| ADNc | Acide DésoxyriboNucléique complémentaire |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ApoA | Apoprotéine A |
| ApoA2 | Apoprotéine A2 |
| ApoB100 | Apoprotéine B100 |
| ApoC | Apoprotéine C |
| ApoD | Apoprotéine D |
| ApoE | Apoprotéine E |
| BSA | Bovin Serum Albumin |
| BID | BH3 Interacting Domain |
| CETP | Cholesteryl Ester Transfer Protein |
| COL6A | Collagène type VI, alpha 2 |
| CSF -1 | Colony Stimulating Factor 1 |
| Ct | Cycle treshold |
| CTL | Contrôle |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGR1 | Early Growth Response 1 |
| ERK | Extracellular signal-Regulated Kinase |
| FBS | Fetal Bovin Serum |
| FGF | Fibroblast Growth factor 1 |
| FOS | c-Fos |
| G-CSF | Granulocyte - Colony Stimulating factor |
| GM-CSF | Granulocyte M - Colony Stimulating factor |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HMOX | Heme-Oxygenase |
| I-CAM 1 | Intercellular Cell Adhesion Molecule 1 |
| IDL | Intermediate Density Lipoprotein |
| IGF-1 | Insulin Growth Factor 1 |
| IGFBP3 | Insulin Growth Factor Binding Protein 3 |
| IGFBP5 | Insulin Growth Factor Binding Protein 5 |
| IKK | Ikappaß Kinase |
| IL-1 | Interleukine 1 |
| IL-2 | Interleukine 2 |
| IL-6 | Interleukine 6 |
| IL-8 | Interleukine 8 |
| INF γ | Interféron gamma |
| i-NOS | intracellular Nitric Oxyde Synthase |
| IRAK | IL1 Receptor Associated Kinase |
| ITGA5 | Integrin, alpha5 |

| | |
|---------------------------|---|
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |
| KNLS5 | Mitotic Kinesin Like Protein 1 |
| LBP | LPS Binding Protein |
| LCAT | Lecithin Cholesterol Acetyl Transferase |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRR | Leucine Rich Repeat |
| MAPK | Mitogen Activated Protein Kinase |
| MAPKK | Mitogen Activated Protein Kinase Kinase |
| MAPKKK | Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase |
| MCP-1 | Monocyte Chemoattractant Protein 1 |
| MCP-4 | Monocyte Chemoattractant Protein 4 |
| M-CSF | Macrophage Colony Stimulating Factor |
| MDM2 | Mouse Double Minute 2 |
| MEK | Mitogen activated protein Kinase |
| MEKK | Mitogen activated protein Kinase Kinase |
| MIP-1 α et β | Macrophage Inflammatory Protein 1 α et β |
| MMP 9 | Matrix Metalloproteinase 9 |
| MMP 14 | Matrix Metalloproteinase 14 |
| MMP 19 | Matrix Metalloproteinase 19 |
| NFKB | Nuclear Factor KappaB |
| NO | Nitric Oxyde |
| OPN | Ostéopontine |
| OxLDL | Oxydised Low dencity Lipoprotein |
| p 21 | Cyclin dependent kinase Inhibitor 1A |
| PAI-1 | Plasminogen Activator Inhibitor 1 |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PECAM | Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 |
| PGI2 | Prostaglandine I2 |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3 Kinase |
| PKR | Protein kinase RNA Regulated |
| PMA | Phorbol Myristate Acetate |
| RAF-1 | c-RAF-1 |
| RT | Reverse Transcription |
| S100A8 | S100 Calcium binding protein A8 (Calprotectin) |
| MnSOD2 | Manganèse Superoxyde dismutase 2 |
| SPPR1B | Small Proline Rich Protein 1 B (Cormifin) |
| SRE | Serum Response Element |
| SRF | Serum Response Factor |

| | |
|--------------|--|
| TAK1 | TGF α Associated Kinase1 |
| TB10 | Thymosin β 10 |
| TBXA2 | Thromboxane A2 Receptor |
| TF | Facteur Tissulaire |
| TGF β | Transforming Growth Factor β |
| THBD | Thrombomoduline |
| TIMP1 | Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 |
| TIMP2 | Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 |
| TLR | Toll like receptor |
| TNF α | Tumor Necrosis Factor α |
| TRAF6 | TNF α Receptor Associated Factor |
| uPAR | Plasminogen Activator Urokinase Receptor |
| V-CAM 1 | Vascular Cell Adhesion Molecule 1 |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth factor |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |

I. Introduction générale :

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des causes de décès les plus fréquentes en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis. L'athérosclérose en est un exemple. Les lésions vasculaires entraînent des affections cliniques par deux mécanismes principaux :

- Le rétrécissement ou oblitération complète de la lumière des vaisseaux, soit progressif (par exemple par l'athérosclérose), soit brutal (par exemple par une thrombose), entraînant un déficit important du flux sanguin au niveau des tissus.
- La fragilisation de la paroi des vaisseaux qui entraîne une dilatation ou une rupture.

L'artériosclérose est définie par l'épaississement, le durcissement et la perte d'élasticité des parois artérielles. La cause de cette diminution peut varier. L'athérosclérose en est la forme la plus connue : l'épaississement et le durcissement sont les conséquences d'un processus pathologique. Elle touche des artères de taille moyenne dans lesquelles l'intima devient plus épaisse suite à la présence de quantités importantes de macrophages, cellules musculaires lisses, lymphocytes, lipides, tissu conjonctif et dépôts calciques. Cela aboutit à la formation d'une lésion fibreuse accompagnée d'inflammation (fig. 1.1). Les artères les plus touchées sont l'aorte, les coronaires, les carotides, les iliaques, les fémorales et les cérébrales.

L'athérosclérose est en réalité une maladie plurifactorielle complexe mettant en jeu des processus variés.

II. L'athérosclérose :

Avant de décrire l'athérosclérose, rappelons brièvement la structure d'une artère normale.

1. Structure d'une artère :

Les artères sont divisées en 3 classes selon leur taille et leur structure : (Cotran *et al.*, 2000)

- Les artères élastiques de grand calibre comme l'aorte.
- Les artères musculaires de moyen calibre comme les artères coronaires.
- Les petites artères qui cheminent à l'intérieur des tissus, organes et parenchymes.

La paroi des vaisseaux sanguins est, elle, composée des couches suivantes en partant de la lumière vasculaire : (Ross *et al.*, 1976) (fig1.2)

- ***L'intima*** constituée :
 1. d'une couche unique de cellules endothéliales formant une couverture étanche, reposant sur une lame basale.
 2. d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique, formant la subendothéliale.
 3. d'une lame plus ou moins continue de fibres élastiques constituée d'élastine : la limitante élastique interne.
- ***La média*** constituée :
 1. de cellules musculaires lisses disposées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires. Le nombre de couches varie suivant le type d'artère.
 2. d'une lame d'élastine : la limitante élastique externe.

La média est avasculaire sauf dans sa partie externe qui reçoit l'irrigation des *vasa vasorum* de l'adventice.
- ***L'adventice*** composée :
 1. d'un tissu conjonctif riche en collagène et en fibres élastiques.
 2. des *vasa vasorum* qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et la partie externe de la média.
 3. un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés.

2. Facteurs de risque :

Les facteurs de risque peuvent être classés en facteurs constitutifs, en facteurs de risque élevés et faibles (Cotran *et al.*, 2000 ; Stevens *et al.*, 1997).

Les risques élevés sont entre-autres :

1. ***L'hyperlipidémie*** : un taux de cholestérol (LDL ou Low Density Lipoprotein) élevé (>200 mg/dl) est un des risques majeurs.
2. ***L'hypertension*** : il existe une relation entre une pression sanguine élevée et la sévérité de l'athérome.
3. ***Le diabète*** : le diabète sucré est source d'hypercholestérolémie et augmente considérablement la prédisposition à l'athérosclérose.
4. ***Le tabagisme*** : la nicotine est très nocive pour l'endothélium. Cela favorise fortement l'athérosclérose sans doute par une perturbation des fonctions endothéliales.
5. ***L'homocystéine*** : des concentrations au-delà de 20 μ M sont associées au développement de la pathologie et à un risque accru d'un décès pour des malades déclarés (Wang *et al.*, 2001).

Dans les risques constitutifs, nous retrouvons :

1. ***L'âge*** : le nombre et la sévérité des lésions augmentent avec l'âge. Il y a une progression lente de la maladie qui peut commencer dès l'enfance.

2. *Le sexe* : l'athérome est beaucoup plus fréquent chez l'homme que chez la femme jusqu'à 55 ans ; plus tard, la sévérité des lésions augmente rapidement chez la femme. Les oestrogènes joueraient un rôle protecteur avant la ménopause.
3. *Les antécédents familiaux* : L'hypercholestérolémie familiale, par exemple, est une maladie autosomale dominante qui touche le récepteur aux LDL natives. Cela engendre une perturbation du transport et du métabolisme du cholestérol et aboutit à une augmentation importante des LDL circulantes (Rubin *et al.*, 1999).

Il existe également **des risques légers** comme *l'obésité, le stress et la sédentarité*.

3. Hypothèse de la réaction à l'agression :

L'hypothèse la plus largement acceptée comme cause de l'athérosclérose est l'hypothèse de la réponse à l'agression. (Sirica, 1996 ; Ross, 1993 et 1995; Cotran *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 1988 ; Cabanne *et al.*, 1986) (fig. 1.3)

Cette théorie propose que les lésions initiales de l'athérosclérose sont une réponse à divers types d'agressions (l'hypercholestérolémie, le tabac, l'hypoxie, l'homocystéine, les agents mécaniques ou un agent viral) subies par l'endothélium. Ces lésions conduisent à une augmentation de l'expression des facteurs de croissance, des cytokines, des molécules d'adhérence (I-CAM1, V-CAM1, PECAM) et de la perméabilité de l'endothélium (Demuth *et al.*, 1995). Suite à cela, l'adhérence des monocytes à l'endothélium est accrue. La liaison monocytes-cellules endothéliales fait intervenir les sélectines, puis les intégrines, suivie d'une migration dans l'intima et leur différenciation en macrophages.

Une autre conséquence est l'entrée des lipoprotéines dans l'intima. En cas d'hypercholestérolémie, les LDL sont en quantité importante dans le sang. Elles traverseront facilement la barrière endothéliale à des sites de perméabilité accrue. Le taux d'antioxydants dans l'intima étant faible par rapport au taux sanguin, les LDL y seront progressivement oxydées. Les macrophages se chargeront de ces lipides modifiés suite à une reconnaissance de ceux-ci par des récepteurs scavengers (définis plus loin au point III.4) et se transformeront alors en cellules spumeuses (Pataki *et al.*, 1992). Ce premier stade est appelé « **strie lipidique** ». Ce type de lésion peut se retrouver chez n'importe quel individu, même jeune.

Les plaquettes interviennent également : après leur activation, elles adhèrent à l'endothélium ou aux leucocytes déjà adhérents et sécrètent, entre autres, du PDGF et du TGF β .

La libération des différents facteurs (PDGF, TNF α , IL1) par les macrophages, par exemple, ainsi que les LDL modifiées, entraînent également la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Celles-ci produisent de la matrice extracellulaire qui contient du collagène, de l'élastine, des protéoglycans, et des glycosaminoglycans. Certaines cellules musculaires lisses peuvent aussi accumuler des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme et former des cellules spumeuses. Ce deuxième stade se nomme « **la lésion fibro-graisseuse** ». On retrouve également des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) dans ces lésions. Pour certains auteurs, l'athérosclérose pourrait s'expliquer par une réponse auto-immune.

Le dernier stade, « **la plaque fibreuse** » (Rubin *et al.*, 1999), est caractérisé par :

1. Une chape fibreuse de tissu conjonctif qui contient des cellules musculaires lisses, des macrophages, des lymphocytes, des cellules spumeuses et du tissu conjonctif dense.
2. Un cœur nécrotique dans lequel on retrouve des débris cellulaires, des cristaux de cholestérol et des cellules spumeuses.
3. De nouveaux vaisseaux sanguins.
4. Des dépôts de calcium

Ce développement fait donc intervenir plusieurs acteurs cellulaires dont les relations entre eux sont complexes (fig. 1.4). Mais les lipoprotéines jouent également un rôle essentiel, comme détaillé dans le chapitre suivant.

III. Les lipoprotéines et leurs rôles dans l'athérosclérose :

Les principaux lipides du plasma sont :

1. Les triglycérides
2. Les phospholipides (principalement la lécithine et la sphingomyéline)
3. Les acides gras
4. Le cholestérol sous forme libre ou estérifiée

De par leurs propriétés hydrophobes, les lipides sont véhiculés dans le sang sous forme de lipoprotéines, complexes formés par l'association de ces lipides à des protéines et en particulier les apoprotéines.

1. Structure des lipoprotéines :

Les lipoprotéines sont composées d'un noyau central de lipides neutres (triglycérides ou esters de cholestérol) entouré par une couche de lipides polaires (phospholipides ou cholestérol libre) et d'apoprotéines. Chaque lipoprotéine peut contenir plusieurs apoprotéines. Les lipoprotéines se répartissent en 5 classes selon leur densité, leur taille, leur contenu en lipides et en apoprotéines (tableau 1.1) (Rubin *et al.*, 1999) :

1. Les chylomicrons
2. Les Very Low Density Lipoproteins (VLDL)
3. Les Intermediate Density Lipoproteins (IDL)
4. Les Low Density Lipoproteins (LDL) (fig. 1.5)
5. Les High Density Lipoproteins (HDL)

2. Métabolisme des lipoprotéines :

Le métabolisme des lipoprotéines se réalise selon 2 voies : la voie endogène et la voie exogène (Rubin *et al.*, 1999; Cotran *et al.*, 2000 ; Woolf, 1998) (fig. 1.6).

La voie exogène comprend le transport des lipides de l'intestin au foie. Le cholestérol et les acides gras provenant d'un repas sont absorbés par la muqueuse intestinale. Les acides gras sont transformés en triglycérides par greffage sur le glycérol. Ces triglycérides et le cholestérol sont incorporés dans les chylomicrons (qui sont structurés par les

apoprotéines E, C2, ...) et retournent dans le sang via la lymphe. Les chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase libérant progressivement les acides gras dans les muscles et les tissus adipeux. Les chylomicrons résiduels, riches en cholestérol, se lient aux récepteurs spécifiques des hépatocytes et sont alors pinocytés.

Commence alors **la voie endogène** : des triglycérides, du cholestérol et des apoprotéines (dont l'Apo B100) sont accumulés dans le foie pour former les VLDL qui sont sécrétées dans la circulation. Les VLDL contiennent plusieurs apoprotéines (ApoB100, ApoE et ApoC), sont riches en triglycérides, mais possèdent peu de cholestérol. La lipoprotéine lipase va hydrolyser les VLDL avec libération des acides gras dans les tissus avoisinants et deviennent progressivement des IDL. Celles-ci contiennent moins de triglycérides, plus de cholestérol et sont structurées par l'ApoB100 et l'ApoE. Certaines IDL seront directement recapturées par le foie par liaison au récepteur à l'ApoB100/E et seront reconverties en VLDL. Les autres resteront dans la circulation sanguine et y seront converties en LDL. Le noyau des LDL est exclusivement constitué d'esters de cholestérol, tandis que la couche périphérique ne comporte plus qu'une seule apoprotéine : l'ApoB100.

La majorité des LDL (70 %) sera acheminée vers le foie où elle sera captée par le récepteur aux LDL natives (ou récepteur ApoB100/ApoE), puis catabolisée dans les lysosomes. D'autres LDL seront capturées par des cellules périphériques comme les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les cellules lymphoïdes dans lesquelles le cholestérol sera stocké dans le cytoplasme.

Le transport inverse du cholestérol est assuré par les HDL qui captent le cholestérol des cellules périphériques. Le cholestérol est estérifié par la LCAT (Lecithin Cholesterol Acetyl Transferase) et transféré aux LDL ou IDL grâce à la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein). Les HDL sont synthétisées dans le foie et l'intestin (Rader *et al.*, 2002) et sont structurées entre autres par les ApoAI, ApoAII et ApoD. Leurs fonctions majeures sont : (Nofer *et al.*, 2002)

1. Un réservoir pour les apoprotéines, particulièrement l'ApoE et l'ApoCII.
2. Le transport inverse du cholestérol (de la périphérie vers le foie).

3. Rôles des lipoprotéines dans l'athérosclérose :

Il faut tout d'abord distinguer les lipoprotéines dites **athérogènes** : les LDL, mais aussi leurs précurseurs, c'est-à-dire les VLDL et IDL. C'est ce qu'on appelle le mauvais cholestérol et il existe un lien direct entre la probabilité de développer une maladie cardiovasculaire liée à l'athérosclérose et des concentrations plasmatiques élevées en LDL. Ce risque augmente lorsqu'il est combiné avec d'autres facteurs de risque comme le tabagisme, l'âge,... En cas d'hypercholestérolémie et suite à une blessure locale de l'endothélium qui va augmenter la perméabilité de la barrière endothéliale, les LDL pénètrent facilement dans l'intima (Nofer *et al.*, 2002). Les LDL vont y être modifiées : elles s'oxydent progressivement par des radicaux libres produits par les macrophages et les cellules endothéliales (Sirica, 1996).

L'oxydation commence au niveau des lipides qui composent les LDL. Ces mmLDL (minimally modified LDL) seront encore reconnues par les récepteurs aux LDL natives et induisent l'expression de plusieurs gènes au niveau des cellules endothéliales : le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), des molécules d'adhérence, les CSF (Colony

Stimulating Factor) et des facteurs procoagulants comme le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1).

Les mmLDL vont s'oxyder davantage au niveau de la partie protéique des LDL et donc de l'ApoB100, indispensable pour la reconnaissance au récepteur des LDL natives. Les oxLDL, fortement oxydées, ne seront donc plus reconnues par les récepteurs aux LDL natives, mais bien par les récepteurs scavengers localisés au niveau des macrophages et des cellules musculaires lisses, ce qui favorisera la formation de cellules spumeuses (fig. 1.7).

Ces LDL oxydées contribuent à la formation des lésions. Elles ont les effets suivants (fig1.8) (Cotran *et al.*, 2000 ; Witztum *et al.*, 1991 ; Demuth *et al.*, 1995) :

1. Elles sont facilement ingérées par les macrophages grâce à leur reconnaissance par des récepteurs scavengers et entraînent la formation des cellules spumeuses.
2. Elles ont un effet chimotactique sur les monocytes et les lymphocytes T.
3. Elles augmentent l'adhérence des monocytes en induisant l'expression des molécules d'adhérence endothéliale telle VCAM-1.
4. Elles inhibent la mobilité des macrophages déjà présents dans les lésions et induisent l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β par ceux-ci.
5. Elles stimulent la libération de facteurs de croissance, de MCP-1 et M-CSF, qui favorisent respectivement le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages.
6. Elles sont toxiques pour les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.
7. Elles sont immunogènes.
8. Elles augmentent la perméabilité vasculaire.
9. Elles induisent l'apoptose (Salvayre *et al.*, 2002).

À côté des lipoprotéines pro-athérogènes, il y a les HDL qui, au contraire, exercent un effet **anti-athérogène**. On sait d'ailleurs qu'il existe une relation inverse entre un taux plasmatique élevé de HDL et le risque de développer des symptômes consécutifs à l'athérosclérose. On explique cet effet anti-athérogène par diverses raisons (Nofer *et al.*, 2002) :

1. Les HDL favorisent le transport inverse du cholestérol : Elles ramènent le cholestérol en excès dans les tissus périphériques vers le foie où il sera métabolisé.
2. Elles induisent la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.
3. Elles protègent les cellules endothéliales.
4. Elles affectent les sécrétions de l'endothélium : Les HDL augmentent la sécrétion de PGI₂ (Prostacycline). Cette molécule possède une activité vasodilatatrice, inhibe l'agrégation des plaquettes et diminue la production de facteurs de croissance comme le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou l'EGF (Epithelial Growth Factor) qui induisent la prolifération des cellules musculaires lisses.
5. Les HDL inhibent l'activation et l'adhérence des monocytes à l'endothélium : Les HDL inhibent le chimotactisme des monocytes ainsi que l'expression de certaines molécules d'adhérence : V-CAM1, ICAM-1 et la E-sélectine.

6. Les HDL régulent la coagulation : Elles augmentent l'expression du facteur X mais aussi de la protéine C et S, inhibitrice de la coagulation (fig. 1.9)
7. Les HDL inhibent l'activation des plaquettes.
8. Elles jouent un rôle d'antioxydant : Elles réduisent l'oxydation des LDL entre autres grâce à l'activité de la paraoxonase (PON) qui catalyse la dégradation des oxLDL.

4. Les récepteurs des lipoprotéines :

a) Les récepteurs aux LDL natives :

Les récepteurs aux LDL natives se situent en membrane des cellules hépatiques et des cellules des tissus périphériques. Ils reconnaissent les LDL en se liant à l'ApoB100 et l'ApoE. Ces récepteurs sont constitués de 5 domaines (Haber, 1995) (fig. 1.10 a) :

- b. Un domaine N-terminal de liaison au ligand (ApoB100/E) composé de 7 domaines répétés et riches en cystéines.
- c. Un domaine ayant une homologie avec l'EGF (Epidermal Growth Factor)
- d. Un domaine fortement glycosylé qui sert de protection contre les protéases
- e. L'hélice α transmembranaire
- f. Le domaine cytosolique C-terminal

Ce récepteur permettra l'endocytose des LDL via une vésicule tapissée de clathrine. Les LDL se retrouvent dans un endosome précoce, puis un endosome tardif, pour finir dans les lysosomes où elles seront dégradées. Le cholestérol sera libéré et pourra être utilisé pour diverses fonctions dont une relocalisation en membrane plasmique, être stocké sous forme de cholestéryl ester, former les sels biliaires ou être utilisé pour la synthèse des stéroïdes. Ces récepteurs sont régulés par le taux de cholestérol sanguin. Si celui-ci est en excès, le récepteur sera fortement exprimé et la capture du cholestérol sera importante. Par contre, si le taux de cholestérol est faible, le récepteur sera faiblement exprimé.

b) Les récepteurs aux LDL modifiées :

Ces récepteurs, appelés également récepteurs scavengers, reconnaissent des LDL modifiées et ont une structure différente des récepteurs aux LDL natives (Shirai, 1999).

Ils sont composés de 6 domaines (fig. 1.10 b) :

1. Un domaine cytosolique N-terminal
2. Une hélice α transmembranaire
3. Un domaine « spacer »
4. Une triple hélice α
5. Un domaine collagène like
6. Un domaine de liaison au ligand riche en cystéines

Ils sont divisés en 2 grandes classes principales:

- a. La classe A que l'on retrouve sur les macrophages et les cellules musculaires lisses. Ils interviennent dans la formation des cellules spumeuses.

- b. La classe B (CD36, SRB1) qui se trouve sur les monocytes, les macrophages, les plaquettes, les hépatocytes et lie les LDL oxydées. On les retrouve également sur les cellules des tissus stéroïdogènes (synthétisant les stéroïdes) qui lient les HDL natives pour fournir le cholestérol aux organes qui en ont besoin.

IV. Les monocytes-macrophages :

1. Dans le contexte de l'athérosclérose :

Les monocytes/macrophages jouent un rôle très important dans la mise en place des lésions typiques de l'athérosclérose. L'athérosclérose, selon l'hypothèse déjà décrite de la réaction à l'agression (point II.3) est souvent accompagnée, dans les étapes précoces, d'un contexte inflammatoire qui fait intervenir des molécules particulières appelées cytokines (Plutzky, 2001). Parmi les cytokines, on distingue les monokines produites par les monocytes, les lymphokines produites par les lymphocytes, des interleukines synthétisées par les leucocytes en général - mais également par de nombreux autres types cellulaires - et enfin les facteurs de croissance (PDGF, VEGF,...). Ce contexte inflammatoire localisé affecte l'endothélium, qui se met à exprimer des protéines d'adhérence, des chémokines, des cytokines, ce qui va favoriser la migration des monocytes de la lumière vasculaire vers l'intima. Ce phénomène est appelé la diapédèse (fig. 1.11).

L'entrée du monocyte dans l'intima se déroule en une série d'étapes. La première étape est l'activation et l'attraction des monocytes par l'endothélium par l'intermédiaire de cytokines chimotactiques (ou chémokines) sécrétées par les cellules endothéliales (Reape *et al.*, 1999 ; Gangur, 2002). Celles-ci sont divisées en 2 classes :

1. Les CC chémokines (CC pour 2 cystéines) avec comme exemple le MCP-1
2. Les CXC chémokines (les 2 cystéines sont séparées par 1 acide aminé) avec comme exemple l'IL-8.

L'activité biologique de ces chémokines est médiée par des récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G. Il existe 9 récepteurs pour les CC chémokines et 5 pour les CXC chémokines. Chaque récepteur peut se lier à plusieurs ligands et beaucoup de chémokines peuvent interagir avec plusieurs récepteurs (fig. 1.12) (Reape *et al.*, 1999).

Par exemple, le récepteur CCR2 reconnaît les MCP-1, 2, 3 et 4 et les récepteurs CXCR1 et CXCR3 reconnaissent, entre autres, l'IL8. Les chémokines exprimées constitutivement jouent un rôle dans le trafic des leucocytes et secondairement dans le développement des organes lymphoïdes alors que les chémokines induites interviennent dans les réponses inflammatoire, immune et angiogène.

Le chimotactisme est une fonction commune à toutes les chémokines. Les molécules d'adhérence et les chémokines travaillent en concert pour faciliter le trafic des leucocytes entre la circulation sanguine et les tissus. Certaines cytokines (IL-1, TNF- α) activent les séllectines sur les cellules endothéliales et les chémokines activent les intégrines sur les leucocytes pour faciliter le rolling et leur adhérence à l'endothélium durant la diapédèse.

Durant la phase de **rolling**, le monocyte roule sur l'endothélium et est ralenti par une série d'interactions faisant intervenir les sélectines et plus particulièrement les E-sélectines, P-sélectines et L-sélectines. Les deux premières sont exprimées par les cellules endothéliales activées et la L-sélectine par les leucocytes. (O'Brien *et al.*, 1994; Prost *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2002)

- La E-sélectine lie le motif Sialyl Lewis X porté par le ligand ESL-1 (E-Selectin Ligand 1) exprimé par les monocytes, les lymphocytes T et les polymorphonucléaires.
- La P-sélectine est stockée au niveau des corps de Weibel Pallade situées en surface cellulaire des cellules endothéliales au repos. L'activation de la cellule endothéliale conduit à l'exocytose des corps de Weibel Pallade avec libération du facteur de Von Willebrand et expression en membrane de la P-sélectine. Celle-ci est reconnue par le ligand PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1) sur le monocyte.
- La L-sélectine lie 3 ligands exprimés à la surface de la cellule endothéliale.

La troisième étape est le **triggering**. Elle conduit à l'activation d'intégrines leucocytaires permettant la liaison ferme des monocytes à l'endothélium. Le monocyte adhère fermement à l'endothélium par interaction entre intégrines et CAM (Cell Adhesion Molecule). L'activation des intégrines est médiée par la liaison des sélectines à leurs ligands. De plus, le monocyte produit, entre autres, l'IL-1 β et le TNF- α . Ces 2 cytokines sont rapidement produites durant la réponse inflammatoire. Cela induit, par la cellule endothéliale, la synthèse d'IL-8 et de MCP-1 qui sont des chémokines. Ces chémokines vont recruter d'autres monocytes mais aussi activer les intégrines, ce qui favorisera l'adhérence des monocytes à l'endothélium (O'Brien *et al.*, 1994; Prost *et al.*, 2000). Les intégrines sont composées de 2 chaînes polypeptidiques transmembranaires α et β et sont exprimées par les leucocytes et les cellules endothéliales.

Le monocyte, fermement attaché à l'endothélium, va traverser l'endothélium et se retrouver dans l'intima. Ce processus est appelé **diapédèse** à proprement parler. Pour cela, le monocyte doit se déformer et traverser l'endothélium en s'immisçant à travers les jonctions serrées entre deux cellules endothéliales. Cette transmigration est médiée en partie par l'interaction entre 2 molécules PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) exprimées l'une sur le monocyte et l'autre sur la cellule endothéliale (Prost *et al.*, 2000).

Quand le monocyte a passé la barrière endothéliale, il se différencie en macrophage suite à la présence de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) qui active également la prolifération des macrophages. Le M-CSF est produit par les cellules endothéliales activées. De plus, comme déjà signalé, le MCP-1 joue également un rôle dans l'accumulation des macrophages sous l'endothélium : étant sécrété par les cellules endothéliales activées et les macrophages, le MCP-1 va amplifier l'influx de monocytes dans l'intima et ceux-ci se différencieront en macrophages, puis formeront de nouvelles cellules spumeuses lorsqu'ils sont en contact avec des LDL fortement oxydées (voir point II.3) (Reape *et al.*, 1999).

Dans les lésions plus avancées de l'athérosclérose, en plus du MCP-1, d'autres CC chémokines interviennent également :

1. MIP-1 α et MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein). Ces molécules sont exprimées par les lymphocytes T (recrutés par l'IL-8) et sont chémoattractantes pour les monocytes.
2. MCP-4 (Monocyte Chemoattractant Protein) est aussi exprimé dans les plaques avancées par les cellules endothéliales.

En ce qui concerne les CXC chémokines, l'IL-8 joue un rôle chémoattractant pour les lymphocytes T, mais est aussi un facteur angiogène et peut induire la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses.

Le **macrophage** n'est pas seulement une cellule présentatrice d'antigène mais il libère aussi une série de médiateurs (Reape *et al.*, 1999). Il produit différentes cytokines et facteurs de croissance (fig. 1.13) qui sont des médiateurs impliqués dans l'inflammation et qui régulent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses à l'intérieur des lésions athérosclérotiques. De plus les macrophages produisent des dérivés actifs de l'oxygène, ce qui favorise l'oxydation des LDL.

Le macrophage est également la source principale de cellules spumeuses, car ils s'engorgent de LDL oxydées en exprimant des récepteurs scavengers. Cette entrée de oxLDL induit l'expression de certains gènes encodant : (Munro *et al.*, 1988)

1. **Des facteurs de croissance** comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1).
2. **Des cytokines** comme l'IL-1, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) qui induisent une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et l'INF γ (Interféron γ) et l'IL-2. (Fazio *et al.*, 2001 ; Inagaki, 2002)
3. **Des molécules chimiotactiques** telles que le MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)
4. **Des récepteurs scavengers CD36** exprimés par les macrophages (Nicholson, 2001)

L'induction de ces gènes va dans le sens d'une amplification du processus inflammatoire. Tous ces facteurs n'agissent pas seuls : la synthèse d'une molécule peut conduire à l'expression d'une seconde molécule dans une cellule cible. Par exemple : la production d'IL-1 ou TNF- α par les macrophages peut induire l'expression de PDGF par les cellules musculaires lisses.

Le monocyte-macrophage joue donc un rôle critique dans les réponses inflammatoires, en général, et dans l'athérosclérose, en particulier.

2. Activation par le LPS :

Le LPS est le principal constituant de la membrane des bactéries Gram négatives (fig. 1.14). Il est la cause majeure des septicémies, chocs septiques et du syndrome de réponse inflammatoire systémique. Rien qu'aux USA, plus ou moins 50.000 personnes décèdent chaque année suite à un choc septique ou au syndrome de réponse inflammatoire. Mais le LPS constitue également un modèle fort étudié d'activation des monocytes *in vitro*, que nous utilisons comme référence dans ce travail. Nous allons donc décrire, brièvement, le mode d'action du LPS sur les cellules monocytaires (pour revue, voir Guha *et al.*, 2001).

La stimulation des monocytes par le LPS va activer différentes voies de signalisation ainsi que plusieurs facteurs de transcription (fig. 1.15). Dans le sang, le LPS va former un complexe avec une protéine plasmatique appelée LPS Binding Protein (LBP). Ce complexe, une fois formé, va se lier au récepteur CD14. Le CD14 est exprimé à la surface des cellules myéloïdes via une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol). Lors d'une réponse immunitaire, un des premiers événements déclenchés est l'activation des macrophages. Les récepteurs TLRs (Toll Like Receptors) de la famille des protéines Toll sont situés en membrane des monocytes/macrophages et sont constitués de 2 parties : un domaine de signalisation intracellulaire et un domaine extracellulaire fait de répétitions riches en leucine (LRR) qui sont impliquées dans la reconnaissance du pathogène (fig. 1.16). Le récepteur TLR4 reconnaît le LPS et induit l'activation des différentes voies de signalisation. De plus, une protéine MD-2 est associée au récepteur TLR4 à la surface cellulaire. Cette protéine est nécessaire pour l'activation des voies de transduction du signal, décrites ci-dessous.

1. La voie de IKK-NFκB :

Dans une cellule au repos, le facteur de transcription NFκB, constitué de p50 et p65 dans les monocytes, forme un complexe cytosolique avec IκB. La liaison à IκB empêche NFκB d'être transloqué dans le noyau et de se lier à sa séquence consensus sur l'ADN. En présence de LPS et suite à la reconnaissance LPS-TLR4, la voie IKK-NFκB est activée via MyD 88, IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase) et TRAF6 (TNF-α Receptor Associated Factor). Puis, IKKβ est phosphorylé et cette étape peut faire intervenir 2 kinases différentes : TAK1 (TGFβ Associated Kinase1) et MEKK1 (Mitogen Activated Protein Kinase ERK kinase kinase 1). Iκβ, une fois phosphorylé par la kinase IKK (IκB Kinase), se détache du facteur de transcription NFκB et est dégradé par le protéasome. NFκB peut alors être transloqué dans le noyau, se lier à sa séquence consensus et induire l'expression de différents gènes (IL1-β, TF, c-Rel,...). Cette voie de signalisation est régulée, entre autres, par la voie de la PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-Akt. Une autre kinase, qui n'a pas encore été identifiée, peut phosphoryler p65 sans affecter la dégradation d'IκB, entraînant également l'activation de NFκB.

2. La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) :

a) La voie ERK :

Cette voie de transduction du signal fait intervenir Ras, c-Raf (=MAPKKK), MEK 1/2 (Mitogen Activated Protein Kinase ERK kinase 1) (=MAPKK) et enfin ERK 1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) (=MAPK). Ces différents acteurs sont activés par phosphorylation et activent le facteur de transcription SRE. Celui-ci est un dimère formé d'Elk1 et de SRF (Serum Response Factor).

b) La voie des JNK :

Cette voie fait intervenir les kinases MEKK1/4 (Mitogen Activated Protein Kinase ERK kinase kinase 1), puis MKK4/7, et enfin la JNK (c-Jun N-terminal Kinase) qui

phosphorylent des facteurs de transcription tels que SRE, AP-1 constitué de c-Jun/c-Fos ou c-Jun/ATF-2 et CRE composé du dimère CREB/ATF-1.

c) La voie p38 :

On retrouve, dans cette voie, PKR (Protein Kinase RNA-regulated), puis, MKK3/9 et p38 qui active également différents facteurs de transcription : SRE, CRE et AP-1.

Nous pouvons donc constater que le LPS agit sur la cellule par différentes voies de signalisation et induit des gènes encodant des médiateurs inflammatoires comme les cytokines et chémokines, mais aussi des gènes viraux, des gènes encodant des molécules d'adhérence ou encore des immunorécepteurs. Le tableau 1.2 reprend les différents gènes connus pour être induits par le LPS.

V. L'étude des profils d'expression génique :

Au cours des étapes précoces de l'athérogenèse, on voit donc que les cellules, dont les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses,... sont activées, ce qui affecte leurs profils d'expression génique. Pour étudier ces changements, en conditions pro-inflammatoires et/ou pro-athérogènes, plusieurs approches peuvent être envisagées. On peut suivre des profils d'expression génique en se focalisant sur les protéines ou sur les ARNm. Dans ce travail, nous nous limitons aux profils en ARNm. Nous passerons donc en revue les techniques les plus couramment utilisées pour étudier l'expression génique au niveau ARNm (Kozian *et al.*, 1999 ; Monojemi *et al.*, 2001).

1. Northern blot :

Les ARNm extraits sont séparés par électrophorèse sur gel. Ensuite, ils sont transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon. Leur détection se fait par une sonde d'ADN ou d'ARN, marquée radioactivement, qui s'hybridera à sa séquence anti-complémentaire. Cette approche ne permet l'étude que d'un seul ARNm à la fois et reste peu quantitative. Elle présente néanmoins l'avantage d'être une technique classique et donc maîtrisée, avec également l'information sur la taille du transcrit étudié.

2. Differential Display :

Cette technique permet la comparaison d'expression de gènes pour deux ou plusieurs populations de cellules ou tissus. Cette méthode est dite "sans *a priori*", c'est-à-dire qu'elle permet d'étudier l'ensemble des ARNm présents dans une cellule (fig.1.17).

L'ARN total extrait est rétrotranscrit en ADNc à partir d'amorces polyT terminées par 2 nucléotides aléatoires A, C, G ou T qui s'hybrideront à la queue polyA de l'ARNm. Cette transcription inverse (RT) est suivie d'une PCR utilisant les mêmes amorces que pour la RT et en présence de nucléotides marqués radioactivement. Chaque amorce amplifiera de

l'ADNc pour finalement aboutir à une centaine de fragments d'ADNc. Une partie de l'échantillon PCR est ensuite séparée par une électrophorèse sur gel. L'ADNc amplifié est ensuite visualisé par auto-radiographie. La comparaison des bandes permet de révéler les ADNc amplifiés de façon différentielle.

Cette technique est avantageuse dans les situations où le matériel est limité, car elle requiert très peu d'ARN total. Par contre, elle génère des faux positifs et il faut donc confirmer les résultats par d'autres méthodes.

3. Les microdamiers à ADN :

Les damiers à ADN ou biochips sont formés d'une micro-surface sur laquelle sont greffés des trappeurs (ADN simple brin) (Bellis *et al.*, 1997). Les damiers à ADN peuvent être utilisés soit pour des génotypages, soit pour établir des profils d'expression génique dans des cellules ou tissus donnés. Nous nous limiterons à cette dernière application. Chaque trappeur est spécifique d'un gène et peut s'hybrider à une séquence d'ADNc anti-complémentaire. Les deux séquences forment alors de l'ADN double brin. Le but des damiers est de détecter, en une hybridation, l'expression de plusieurs gènes ou séquences d'ADNc qui sont présents dans un même échantillon à analyser. La détection peut se faire de différentes façons :

- par fluorescence (par détection directe ou indirecte en utilisant des fluorochromes comme la Cyanine 3 et la Cyanine 5)
- par colorimétrie
- par radioactivité

Il existe deux types de damiers à ADN :

- Les damiers à faible/moyenne densité
- Les damiers à haute densité

A. Les damiers à faible/moyenne densité :

Ces damiers comportent un nombre limité de gènes qui sont choisis au préalable (quelques centaines maximum). La réalisation de ce damier implique la synthèse d'ADN trappeurs. Ceux-ci sont des fragments d'ADN, générés par PCR, dont la séquence est spécifique des gènes d'intérêt. Les trappeurs sont ensuite fixés à la surface du support grâce à des robots de haute précision. Les ARNm sont extraits à partir de cellules ou tissus et rétrotranscrits en ADNc, souvent en présence de nucléotides biotinylés. La population d'ADNc obtenue est hybridée sur le damier. Après révélation, les damiers sont scannés et analysés pour quantification des spots. Cette quantification permettra d'analyser les variations d'expression génique dans des situations contrôle et test. Le principe de ce type de damier est illustré à la figure 2.3 des Matériels et Méthodes, pour les damiers à moyenne densité utilisés dans ce travail.

Ce type d'étude présente l'avantage de pouvoir étudier l'expression de plusieurs gènes sur un même damier. Ces damiers sont utilisés pour étudier un très grand nombre de gènes de façon répétée et reproductible. Toutefois, l'élaboration d'un microdamier demande du temps et est généralement assez onéreuse (Schulze *et al.*, 2001).

B. Les damiers à haute densité :

Il existe 2 grands types de damiers à haute densité : soit les trappeurs sont constitués d'oligonucléotides, petites séquences d'ADN de plus ou moins 25 bases fixées sur un support (par photolithographie chez Affymetrix), soit ils sont dérivés d'une librairie d'ADNc greffés sur un support membranaire comme chez RZPD (Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbank, Allemagne).

Dans le premier cas, les oligonucléotides de 25 bases sont définis à partir d'ARNm de référence et peuvent représenter l'ensemble d'un transcriptome. Leur synthèse combine la photolithographie et la synthèse d'ADN. Sur la surface du support, sont fixés des groupements carboxyl protégés par des groupements photolabiles. Certains groupements sont éliminés lorsque le support est éclairé. Ensuite, des déoxynucléotides portant des groupements photolabiles sont ajoutés et se fixeront sur les carboxyl disponibles (fig. 1.18b). Cette étape est répétée plusieurs fois de sorte à générer des oligonucléotides de séquences déterminées sur le damier. Ces damiers sont commercialement disponibles (Affymetrix, USA).

La société RZPD (Ressourcen Zentrum/Primäre Datenbank, Berlin) élabore, par contre des damiers comportant des clones (librairie d'ADNc) qui sont fixés sur des membranes de nylon (22 X 22 cm). Ces damiers sont constitués de milliers de gènes et peuvent couvrir jusqu'à 90 % du génome humain (fig. 1.18a) (Schulze *et al.*, 2001).

Ce type de damier offre l'avantage d'une technique « all transcriptome ».

4. La PCR en temps réel :

La PCR en temps réel permet la quantification d'une séquence d'ADNc définie. L'ARNm est extrait, rétrotranscrit en ADNc et enfin amplifié par PCR à partir d'amorces spécifiques (Bustin, 2000). L'avantage majeur de la PCR en temps réel, est que la détection des produits PCR se fait pendant la phase exponentielle, alors que les méthodes traditionnelles avec dépôts des amplicons sur gel, s'appliquent à la phase plateau. En phase exponentielle, les réactions sont plus spécifiques et plus précises. La détection en fluorescence de la quantité d'ADN est possible et se fait par deux approches :

- Via une sonde fluorescente non-spécifique (par exemple, l'agent intercalant SYBR Green)
- Via une sonde fluorescente spécifique (par exemple, la sonde de type Taqman)

A. Le SYBR Green :

Le SYBR Green est un fluorochrome qui va s'intercaler entre les bases de l'ADN double brin de façon non spécifique et émettre de la fluorescence à une longueur d'onde particulière. Cette fluorescence est mesurée en fin de chaque cycle PCR. Durant la dénaturation de l'ADN, au cours de la PCR, le SYBR Green émet très peu de fluorescence. Par contre, au cours de la polymérisation, il s'intercale entre les bases de l'ADN nouvellement amplifié et émet alors plus de fluorescence. Cela permet de révéler l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque étape d'extension de la PCR (fig 1.19). La fluorescence mesurée sera donc proportionnelle à la quantité d'ADN

amplifié. Le désavantage de ce type de sonde est que l'on détecte tout ADN amplifié même de manière non-spécifique.

B. La sonde Taqman :

Cette sonde, à l'inverse du SYBR Green, est spécifique à une séquence déterminée. Elle est composée de deux fluorochromes : le reporteur à son extrémité 5' et le quencheur à son extrémité 3'. Le quencheur a la capacité de capter l'énergie libérée par le reporteur et de la dissiper sous forme de chaleur lorsque la sonde est intacte (40 bases entre les deux extrémités). Cela supprime donc l'émission de fluorescence par le reporteur. C'est ce qu'on appelle le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Quand l'ADN sera dénaturé, la sonde va se fixer à sa séquence complémentaire. Dans cette étape, le reporteur et le quencheur sont proches, aucune fluorescence n'est donc émise. L'utilisation de la sonde Taqman est combinée à celle de l'AmpliTaq gold R DNA polymérase qui a, à la fois, une activité 3' polymérase combinée à une activité 5' exonucléase. Au cours de la polymérisation, l'activité 5' exonucléase de cette polymérase va hydrolyser la sonde quand elle la rencontre, ce qui sépare le reporteur du quencheur. Le reporteur émettra donc de la fluorescence. Ces différentes étapes se reproduisent à tous les cycles PCR (fig 1.20).

La Real-Time PCR est donc une méthode quantitative qui permet d'analyser plusieurs échantillons dans des situations contrôle et test à partir d'une faible quantité d'ARNm de départ. L'analyse des résultats se fait par un ordinateur relié à l'appareil PCR. (fig1.21)

VI. Objectifs du mémoire :

Comme nous pouvons le constater, le monocyte circulant non différencié en macrophage joue un rôle primordial dans le développement de l'athérome, tout comme les LDL (décrites au point IV).

Enormément d'études ont été réalisées sur l'effet des LDL oxydées sur les macrophages (Klouche *et al.*, 1999 ; Mikita *et al.*, 2001 ; Oida *et al.*, 1997) mais on connaît beaucoup moins les effets des LDL natives sur les monocytes (Han *et al.*, 1998).

Dans ce mémoire, qui s'inscrit dans le cadre du doctorat de Sofia Dos Santos, nous nous intéressons plus particulièrement à l'effet des LDL natives sur les monocytes. En effet, les monocytes sont exposés en première ligne aux fluctuations des taux de cholestérol dans le sang. Il est donc légitime de penser que ceux-ci pourraient être perturbés par ces fluctuations. C'est pour cela que nous avons entrepris une étude des profils d'expression génique de cellules monocytaires (THP-1) en conditions pro-inflammatoire et pro-athérogène. Différentes approches pouvaient être utilisées dans ce but.

Pour tester les effets des LDL sur les monocytes, nous avons décidé de travailler avec des micro-damiers à ADN. Ces damiers sont de type faible/moyenne densité (comme décrits au point V.3.A) et produits chez EAT (Eppendorf Array Technology). Il s'agit des damiers « GeneralChip » portant 202 sondes de capture, ou trappeurs. Ces trappeurs permettent de suivre l'expression de différents gènes impliqués dans divers aspects de la

physiologie cellulaire : réponse au stress, cycle cellulaire, apoptose, adhérence, réponse pro-inflammatoire, signalisation,... Des essais préliminaires ont également été réalisés sur CD, avec les mêmes sondes de capture (General CD). Pour ce travail, nous avons travaillé en étroite collaboration avec les chercheurs d'EAT.

Afin de valider le damier sur notre modèle cellulaire, nous avons également choisi deux contrôles positifs, comme systèmes de référence : le LPS et le PMA. Cette molécule est bien connue pour son rôle dans le déclenchement de la réponse inflammatoire des monocytes. Les différentes voies de signalisation activées par le LPS ont été décrites dans la littérature (point IV) et les gènes induits sont connus. Le second contrôle positif, le PMA est utilisé *in vitro* pour la différenciation du monocyte en macrophage.

Lors de ce travail, nous avons utilisé ces trois damiers :

- Un damier prototype réalisé par Sébastien Toffoli lors de son mémoire l'an dernier avec 17 sondes de capture que nous avons utilisé pour nos premiers essais.
- Le Général CD pour une validation de ce type de support chez EAT. Malheureusement, pour des raisons indépendantes de notre volonté, nous avons dû rapidement abandonner le CD Généraliste.
- La GeneralChip sera l'outil principalement utilisé au cours de ce mémoire. Nous avons testé les effets des LDL, du LPS et du PMA sur les profils d'expression génique de THP-1.

Après analyse des résultats obtenus sur les micro-damiers, nous utiliserons la PCR en temps réel pour confirmer des résultats obtenus sur les damiers à ADN.

Au laboratoire, nous disposons d'un appareil de PCR en temps réel qui offre l'avantage de la simplicité, de la rapidité par rapport au Northern Blot, mais la PCR en temps réel permet surtout une analyse quantitative fiable des ARNm cellulaires. Nous avons utilisé le SYBR Green comme fluorochrome (décrit au point V.4.A) puisque nous réalisons des tests de confirmation. L'utilisation de la sonde Taqman, beaucoup plus onéreuse, n'est pas nécessaire pour ce type d'analyse.

Bien qu'il s'agisse d'un travail préliminaire, nous espérons par cette approche vérifier que les LDL affectent bien le comportement des monocytes et préciser qu'elles seraient les voies métaboliques plus particulièrement touchées.

I. Culture cellulaire :

Le modèle cellulaire utilisé est la lignée monocyttaire THP-1. Cette lignée fut découverte en 1978 à partir de cellules périphériques du sang d'un garçon de un an atteint d'une leucémie monocyttaire aigüe. Les THP-1 sont des cellules en suspension qui se multiplient en formant des grappes.

1) Matériels :

- Milieu de culture complet (tableau 2.1)
- Pipettes de 10 ml et 5 ml stériles emballées individuellement (Sarstedt)
- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson)
- Boîtes de culture T75 (75 cm²) (Costar)
- Bleu de Trypan (Sigma)
- Chambre de Neubauer (Marienfeld)
- Centrifugeuse (Heraeus Sepatech)
- Etuve à 37°C / 5 % de CO₂ (Heraeus Sepatech)
- Microscope (Leica)

2) Méthode :

Le repiquage s'effectue dans un environnement stérile, sous une hotte à flux laminaire vertical, tous les 2-3 jours, ce qui permet de travailler avec une densité cellulaire inférieure à 700.000 cellules/ml.

Les cellules contenues dans 15 ml de milieu, dans une T75, sont transvasées dans 2 tubes de 10 ml et centrifugées à 1.000 rpm pendant 7 min. Au préalable, 100 µl de suspension cellulaire sont conservés pour le comptage cellulaire (voir plus bas).

Après centrifugation, le milieu est décanté et le culot est resuspendu dans du RPMI complet, préchauffé à 37 °C, à raison de 3 millions de THP-1/ml. Dans une nouvelle T75, on ajoute 14 ml de milieu complet et 1 ml de suspension cellulaire (= 3 millions de cellules) pour un volume final de 15 ml. Les cellules sont alors incubées dans une étuve à 37°C / 5 % de CO₂.

Le comptage cellulaire :

Les 100 µl de suspension cellulaire sont prélevés et mélangés avec 100 µl de bleu de Trypan qui colore le cytoplasme des cellules mortes en bleu. Les cellules sont alors déposées par capillarité sur la chambre de Neubauer. Cette chambre comporte un quadrillage particulier se composant de 8 grands carrés, dans lesquels le comptage s'effectue. Le nombre de cellules est calculé comme suit :

$$\text{Nombre de cellules/ml} = \frac{\text{Nombre de cellules dans les 8 carrés} \times 10.000 \times 2}{8}$$

2 : dilution 2 fois (100 µl de suspension cellulaire + 100 µl de bleu de Trypan).

8 : pour ramener le nombre de cellules à 1 carré (= moyenne)

10.000 : facteur volumétrique (0,1 µl par carré)

II. Extraction de lipoprotéines :

1) Principe :

Les LDL sont isolées à partir de sérum humain comme décrit par Poumay et Ronveaux-Dupal (1985). L'expérience se déroule en deux grandes parties :

- Une première ultracentrifugation sur gradient de densité pour isoler les lipoprotéines.
- Une deuxième ultracentrifugation des lipoprotéines sur gradient de densité pour isoler les LDL.

La concentration des LDL est estimée par un dosage Bradford de leur partie protéique.

2) Matériels :

- Pool de sérum humain (Centre Hospitalier Régional de Namur)
- Tubes de 50 ml (Falcon)
- Système de fermeture des tubes d'ultracentrifugation (Beckman)
- Ultracentrifugeuse L7-65 (Beckman)
- Rotor vertical VTI50 (Beckman)
- Bromure de Potassium (Merck)
- Tubes d'ultracentrifugeuse de 40ml (Beckman)
- Pipettes Pasteur (Bilbate)
- NaCl (Merck)
- EDTA (Merck)
- Seringue dotée d'une aiguille 21G (Terumo)
- Cassette de dialyse "Slide A Lyser Dialysis Cassette" 10.000W 0,5 - 3ml de volume (Pierce)
- Tris (Merck)

3) Méthode :

Nous partons d'un pool de sérum humain de 70 ml. Les globules rouges résiduels sont éliminés par centrifugation 5 min à 1000 rpm. La densité du sérum (surnageant) est ajustée à 1,25 g/ml avec du bromure de potassium (KBr) pour obtenir un volume final de 80 ml pesant 100 g. La solution est homogénéisée avant centrifugation et de l'EDTA (0,01%) est ajouté au sérum afin d'éviter l'oxydation des LDL. Le sérum est réparti dans deux tubes d'ultracentrifugeuse (40 ml par tube). Ceux-ci sont équilibrés et scellés par fermeture thermique. Les tubes sont placés dans un rotor vertical VTI50 et centrifugés pendant la nuit (plus ou moins 16 h) à 48.000 rpm (le frein est coupé automatiquement à 800 rpm afin de ne pas déstabiliser le gradient de densité). Après quelques minutes à 4°C, l'extrémité des tubes est coupée à l'aide d'un scalpel. Les lipoprotéines se situent au sommet du tube (fig. 2.1a) et sont récoltées avec une pipette Pasteur à extrémité rétrécie (passée 2-3 secondes à la flamme). La densité des lipoprotéines est ajustée à 1,3 g/ml avec le KBr comme précédemment pour arriver à un volume de 10 ml pesant 13 g. Dans un nouveau tube d'ultracentrifugation, 30 ml de NaCl 0,9 % et EDTA 0,01 % sont déposés et les lipoprotéines sont injectées sous cette couche, à l'aide d'une seringue 21G

munie d'un fin tuyau (fig. 2.1b). Le tout est centrifugé 3h à 48.000 rpm (le frein est coupé à 800 rpm).

En fin de centrifugation, 3 bandes sont nettement visibles et l'on distingue de haut en bas (fig. 2.1c) :

- 1) Les VLDL formant une fine couche laiteuse
- 2) Les LDL formant une couche jaune dorée
- 3) Les HDL formant une couche jaune pâle

Les LDL sont récupérées comme précédemment en éliminant d'abord les VLDL et le tampon NaCl-EDTA situés au-dessus du tube. Elles sont ensuite dialysées 2 jours contre un tampon de dialyse changé régulièrement (tableaux 2.2 et 2.3), et ce par, l'utilisation du système « Slide A Lyser Dialysis Cassette » selon les instructions du fournisseur. Les LDL récoltées sont ensuite filtrées à l'aide d'une seringue munie d'un filtre de 0,45 µm.

Dosage des LDL :

1) Matériel :

- Plaque 96 puits (Costar)
- Microtube (Sarstedt)
- Bio-Rad Protein Assay (Biorad)
- Pipette multichannel (LabSystems)
- BSA à 2 mg/ml (Bovine Serum Albumin) (Pierce)
- Spectrophotomètre (Uvikon 940)

2) Méthode :

L'étalon protéique (BSA) est dilué 40 X pour obtenir une concentration finale de 50 µg/ml. Les LDL sont, elles, diluées 40 et 80 X. Dans une plaque 96 puits, les puits de la première ligne sont remplis avec 320 µl de chaque dilution (étalon-LDL) et un puits avec 320 µl d'eau distillée (blanc). Dans les 5 lignes suivantes, on ajoute 160 µl d'eau. Des dilutions 2 en 2 sont réalisées en mélangeant 160 µl de la première ligne aux 160 µl de la deuxième et ainsi de suite. Nous ajoutons finalement 40 µl de réactif de Bradford dans chaque puits en commençant par les plus dilués. Après 7 min d'incubation à température ambiante, la DO est mesurée à 595 nm. Les concentrations en LDL natives sont déduites sur base des résultats de la courbe standard (faite à partir de la BSA).

III. Test de chémotactisme :

1) Principe :

Ce test nous permet d'estimer la capacité de migration des monocytes en réponse à un gradient de MCP-1 en présence ou non de LDL natives. Il repose sur le principe des chambres de Boyden et se déroule en plusieurs étapes :

- Stimulation des THP-1 avec ou sans les LDL pendant 24 h
- Migration des THP-1 dans le système "Boyden-like"

- Marquage à la calcéine des THP-1 ayant migré
- Analyse au FluoStar

2) Matériels :

- Plaque 24 puits (Costar)
- RPMI base (voir tableau 2.1)
- Microtubes (Sarstedt)
- MCP-1 recombinant humain (R&D, #279-MC)
- Nunc Tissue Culture Inserts 8 μ m (Nunc)
- Étuve à 37°C / 5 % de CO₂ (Heraeus Sepatech)
- Calcéine 1mM dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) anhydre (Vybrant™Cell Adhesion Assay Kit) (Molecular Probes)
- FluoStar (BioRad)

3) Méthode :

1.Stimulation des THP-1 avec ou sans les LDL :

Les cellules sont repiquées la veille en plaque 24 puits à raison de 300.000 cellules par puits dans 500 μ l de RPMI base. Les cellules tests sont stimulées avec 50 μ g/ml de LDL et sont incubées 24 h à 37°C / 5 % CO₂.

2.Migration des THP-1 dans le système "Boyden-like" :

Les cellules stimulées ou non sont transvasées dans les chambres de transmigration, elles-mêmes déposées dans les puits d'une nouvelle plaque 24 puits contenant 500 μ l de MCP-1 à 0,1 μ g/ml. Les cellules sont incubées 2 h à 37°C / 5 % CO₂ et migreront plus ou moins en réponse au gradient de MCP-1 (fig2.2).

3.Marquage à la calcéine des THP-1 ayant migrés:

La calcéine est une molécule fluorescente qui va passer la membrane plasmique des monocytes et s'accumuler dans leur cytoplasme. Son activité sera détectée par fluorescence. Pratiquement, les chambres sont écartées et les 500 μ l du puits contenant les cellules ayant migrés, sont conservés.

Après ajout de 2,5 μ l de calcéine dans chaque puits (5 μ M final), les cellules sont incubées 30 minutes à 37 °C en agitant légèrement toutes les 10 minutes. Les cellules sont ensuite récoltées dans un microtube et centrifugées 5 min à 2.000 rpm. Le culot est lavé, une première fois, dans 500 μ l de PBS et une seconde fois dans 200 μ l de PBS. Ces 200 μ l sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits (blancs = PBS seul).

4.Analyse au FluoStar :

La calcéine est un fluorochrome qui, excité à 485 nm émet de la fluorescence à 520 nm. La mesure de fluorescence se fait grâce au FluoStar couplé à un programme

informatique. Les résultats sont ensuite traités sur Excel. Nous pourrions comparer le nombre de monocytes ayant traversé la membrane dans les puits CTL et dans les puits LDL. Nous verrons alors si les LDL ont un effet sur la capacité des monocytes à être recrutés par le MCP-1.

IV. Études d'expression de gènes :

1. Stimulation des THP-1 :

1) Principe :

Dans ce travail, nous étudions le profil d'expression génique de cellules monocytaires THP-1 dans un contexte pro-inflammatoire et pro-athérogène. Nous utilisons, d'une part, des contrôles positifs (LPS et PMA) pour lesquels des données dans la littérature sont disponibles : le LPS (Lipopolysaccharide) est un agent bactérien qui induit une réponse inflammatoire et le PMA (Phorbol Myristate Acetate) est une molécule induisant la différenciation du monocyte en macrophage.

Dans un contexte pro-athérogène, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux effets des LDL natives sur l'expression génique des THP-1.

2) Matériels :

- Boîtes de culture T75 (Costar)
- PMA (Sigma)
- LPS (Sigma)
- LDL (voir point II)
- RPMI complet et RPMI base (voir tableau 2.1)
- Microtubes (Sarstedt)
- Étuve à 37 °C / 5 % de CO₂ (Heraeus Sepatech)
- Microscope (Leica)

3) Méthode :

Les cellules sont repiquées la veille à 6.10^6 de cellules dans 9 ml de RPMI complet. Le jour de la stimulation, on ajoute la molécule d'intérêt diluée dans 1 ml de RPMI base pour éviter les effets dus à un apport de sérum frais. Le tableau 2.4 reprend les particularités des différentes conditions de stimulation.

2. Extraction d'ARNm :

1) Principe :

L'extraction d'ARNm nécessite de travailler dans un environnement « RNase free ». Il est donc nécessaire de nettoyer la surface de travail ainsi que le matériel utilisé avec du SDS 1%.

L'extraction se fait en 4 étapes majeures:

- 1) Lyse des cellules avec inhibition des RNases
- 2) Fixation de l'ARNm sur la cellulose
- 3) Lavage de la cellulose
- 4) Éluion de l'ARNm

2) Matériels :

- Tips à filtres "RNase free" (Greiner bio-one)
- Tubes 10 ml (Becton Dickinson)
- Microtubes de 1,5 ml (Sarstedt)
- Gants "powder free" (Mölnlycke Health Care)
- Spectrophotomètre, Ultrospec 2100pro (Biochrome)
- Centrifugeuse (Heraeus)
- SDS (Merck)
- Kit Micro-FastTrack 2.0 (Invitrogen) (tableau 2.5)
- Seringues stériles avec aiguilles 21 G (Terumo)
- Éthanol absolu (EtOH) (Merck)

3) Méthode : (selon les instructions du fournisseur) :

1. Lyse des cellules avec inhibition des RNases :

Les cellules sont lysées avec un tampon de lyse contenant le "Protein/RNase degrader" (6.10^6 cellules dans 1 ml). Il s'agit d'un mélange de protéases et de détergent (dont la composition n'est pas donnée). Celui-ci permet de lyser les cellules du tissu, tout en limitant la dégradation de l'ARNm. L'utilisation de seringues 21 G permet d'avoir une lyse efficace des cellules.

2. Fixation de l'ARNm sur la cellulose :

Par la suite, l'ARNm devra être isolé des autres constituants de la cellule. Pour cela, on utilise une cellulose OligodT à laquelle vont se fixer les molécules d'ARNm par leur queue polyA. Les réactifs sont incubés ensemble sous légère agitation pendant 20 min pour permettre à toute la cellulose d'entrer en contact avec l'ARNm.

3. Lavage de la cellulose :

L'étape suivante consiste à laver la cellulose pour éliminer tout ce qui n'est pas ARNm. Les premiers lavages se font avec du Binding Buffer. Cette solution est un mix de sels qui permettra de renforcer la liaison entre la cellulose et l'ARNm. La cellulose est transférée dans une "spin" colonne qui permettra d'éluer l'ARNm ultérieurement. Une série de lavages avec le "Low Salt Wash" permettra de fragiliser les liens ARNm-cellulose.

4. Élution et quantification de l'ARNm :

Le décrochage de l'ARNm se fait grâce à "l'Elution Buffer". Cette solution est très peu chargée en sels et va détacher l'ARNm de la cellulose. L'ARNm va être précipité avec de l'acétate de sodium et de l'EtOH et puis culoté à 16.000 rpm. Le culot est resuspendu dans de l'eau RNase free et une partie est utilisée pour la quantification.

La quantification se fait par spectrophotométrie. Les DO à 260 nm (acides nucléiques) et 280 nm (protéines) sont déterminées sur un échantillon d'ARNm dilué 35 fois. On peut ainsi calculer le ratio 260/280 qui nous donne le rapport entre la quantité d'ARNm et de protéines. Idéalement, ce ratio doit être proche de 2. D'autre part, la DO à 260 nous permet de calculer la concentration en ARNm de notre échantillon par la formule suivante : Concentration finale = Absorbance à 260 x 40 x la dilution

3. Transcription inverse :

1) Principe :

Au départ d'amorces polyT qui s'hybrideront sur la queue polyA de l'ARNm, une Transcriptase inverse va synthétiser un brin d'ADNc. Le principe de la transcription inverse diffère selon le type de manipulation effectuée : une hybridation d'ADNc sur un damier à ADN ou une PCR en temps réel. Les différences se situent au niveau du mix de nucléotides et du mix d'ARNm. Dans le cas d'une RT pour hybridation, le mix de nucléotides inclut des dCTP biotinylés qui permettront la détection indirecte des ADNc. Nous introduisons également des standards internes en même quantité pour les contrôles et les tests qui nous permettront de normaliser la RT. Dans le cas d'une RT pour Real-time PCR, l'ARNm est préalablement traité à la DNase pour dégrader l'ADN génomique contaminant. Le marquage des ADNc à la biotine n'est plus nécessaire.

2) Matériels :

Matériels en commun pour les 2 types de RT :

- Superscript II RNase H (InVitrogen)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- Ribonuclease H (InVitrogen)
- Nuclease free water (Promega)
- OligodT (500ng/μl) (InVitrogen)
- Microtubes autoclavés (Sarstedt)
- Tips à filtres (Greiner bio-one)
- Blocs chauffant à 37 °C, 42 °C et 70 °C (Techne Dri-Block)

Matériels spécifiques pour une hybridation sur damier :

- dNTP set (Roche)
- Biotin-11dCTP 1mM (Perkin-Elmer)
- Bloc chauffant à 95°C (Techne Dri-Block)
- Standards internes 1, 2 et 3 (EAT)

Matériels spécifiques pour une PCR en temps réel :

- dNTP set (Eurogentec)
- DNase (Roche)

3) Méthode :

Le mix1 (tableau 2.6) est préparé. Dans le cas d'une RT pour PCR, avant d'ajouter l'OligodT, le pré-mix est incubé à 37 °C pendant 20 min pour permettre à la DNase de dégrader l'ADN génomique. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation de 5min à 75 °C. Le mix 1 est alors incubé 10 min à 70°C et ensuite 5 min sur glace. Entretemps, les mix 2 et 3 sont préparés (tableau 2.7 et 2.8). 9 µl du mix 3 sont ajoutés dans chaque échantillon et incubés pendant 5 min à température ambiante. Ensuite, on ajoute 1,5 µl de Superscript RII et on incube 1h30 à 42 °C. Cette étape est effectuée une seconde fois dans le cas de la RT-hybridation. Puis, la Superscript est inactivée en incubant 15 min à 70 °C. Afin d'éliminer le brin d'ARNm toujours lié à l'ADNc, on ajoute 1µl de RnaseH et on incube 20 min à 37 °C. Les ADNc sont ensuite dénaturés 3 min à 95 °C pour la RT-hybridation et stockés directement à -20 °C.

4. Damiers à ADN :

4.1 Hybridation des ADNc biotinylés :

1) Principe :

Les ADNc biotinylés obtenus après RT sont hybridés sur le micro-damier à ADN (fig. 2.3). Celui-ci comporte des trappeurs simple brin générés par PCR, qui sont des séquences spécifiques d'une série de gènes d'intérêts (ces différents gènes sont repris en annexe 1). L'hybridation a lieu dans des conditions de stringence favorisant l'hybridation des deux brins anti-complémentaires. Le design du damier utilisé est représenté dans la figure 2.4.

2) Matériel :

- Kit "GeneralChip" (EAT) (tableau 2.9)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Couvre-objet (Genetix Slide Dryer)

3) Méthode :

Le mix d'ADNc est ensuite préparé (tableau 2.10). Les 65 µl du mix sont déposés sur la zone d'hybridation et celle-ci est recouverte par un couvre-objet. La lame est placée dans le thermomixer à 1.400 rpm, 60 °C durant toute une nuit.

4.2 Révélation des ADNc :

1) Principe :

Après hybridation, les lames sont lavées avec du Washing Buffer permettant d'éliminer les ADNc non hybridés et l'ADN génomique contaminant. Les hybrides sont ensuite révélés au moyen d'un anticorps anti-biotine couplé au fluorochrome Cyanine 3. Une deuxième série de lavages (Washing Buffer suivi d'eau) éliminera les anticorps excédentaires ainsi que les sels du Washing Buffer qui augmenteraient le bruit de fond.

2) Matériels :

- Kit "GeneralChip" (EAT)
- Centrifugeuse Centra CL3R (ThermoLifeSciences)
- Tween 20 (Sigma)

3) Méthode :

Lavages post-hybridation :

Après avoir ôté les chambres d'hybridation, les lames sont lavées quatre fois 2 min dans du Washing Buffer constitué d'Unibuffer dilué 40 X et Tween 20 0,1%.

Les lames sont incubées 45 min en présence de 800 µl d'AC anti-biotine couplés à la Cyanine 3 dilués 1.000 fois dans du Blocking Buffer (Unibuffer dilué 4 X + Blocking Reagent 0,1 %). Le Blocking Reagent est un agent bloquant et pourra masquer tous les sites de liaison non-spécifiques. Les lames sont à nouveau lavées 5 fois comme précédemment avec le Washing Buffer, ensuite, on lave deux fois à l'eau. Les lames sont séchées dans une centrifugeuse Centra CL3R à 600 rpm pendant 5 min.

4.3 Quantification des damiers :

Les lames sont scannées à l'aide d'un scanner confocal à différents gains (100, 80 et 60) au moyen du programme ScanArray Express (Perkin Elmer) et les images obtenues sont enregistrées dans un format TIFF 16 bits. En scannant à différents gains, nous pourrions analyser à la fois les gènes fortement et faiblement exprimés. Le fluorochrome est excité à une longueur d'onde de 515 nm et émet de la lumière 555 nm. Les différents spots du damier possèdent une intensité qui est proportionnelle à la quantité de cibles hybridées. Les images sont ensuite quantifiées avec le programme Imagene 4.2 (Biodiscovery) et les résultats traités sur Excel dans le template " GeneralChip " (EAT). Le traitement repose sur une normalisation d'abord par rapport aux standards internes, et ensuite par rapport aux gènes de maintenance, dont l'expression reste en principe stable dans les différentes conditions de stimulations utilisées.

5. Real-Time PCR :

1) Principe :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel permet de suivre cycle par cycle l'accumulation des amplicons, ce qui est rendu possible par l'utilisation du fluorochrome SYBR Green qui a la faculté d'émettre de la fluorescence à 520 nm en s'intercalant dans les doubles brins de l'ADN. Dans notre cas, il s'agit spécifiquement de quantifier de l'ADNc (issu de RT voir point 3). La quantification repose sur le concept de cycle seuil ou Ct (cycle threshold) (fig. 2.5). Le Ct représente le cycle PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond. Étant donné que le Ct se trouve dans la phase exponentielle de la réaction, il est possible de déterminer la quantité d'ADN de départ de l'échantillon sans avoir d'influence de la limitation en matériel. Il existe une corrélation inversement proportionnelle entre ces deux données, le Ct diminuant lorsque la quantité d'ADNc augmente. Les différences observées se font par comparaison des Ct et sont normalisées par rapport à l'expression d'un gène de maintenance, la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) dans notre cas. Comme expliqué au point V.4.A de l'introduction générale, le SYBR Green s'intercale entre tous les ADN double brin générés. Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification, nous réalisons une courbe de dissociation en fin de PCR : après le 40^{ème} cycle, la température augmente progressivement jusqu'à 95°C avec dénaturation des amplicons à leur température de melting. La dissociation des amplicons est associée à une forte chute de fluorescence. Celle-ci est représentée par un pic de dissociation obtenu par la dérivée de la fluorescence en fonction de la température. Si plusieurs amplicons aspécifiques sont présents dans l'échantillon, nous retrouverons, en plus du pic attendu, un ou plusieurs autres pics à des températures différentes.

2) Matériels :

- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Amorces (Applied Biosystems)
- Eau milli Q (Millipore)
- Tips à filtre (Greiner Bio-one)
- Gants (Mölnlycke Health Care)
- Microtubes (Sarstedt)
- Optical tubes (Applied Biosystems)
- Optical caps (Applied Biosystems)
- Plaque 96 puits (Applied Biosystems)
- ABI Prim 7000 (Applied Biosystems)

3) Méthode :

1. Mise au point des concentrations d'amorces en Real-Time PCR :

Les amorces sont choisies grâce au programme « Primer express » qui est adapté à la machine utilisée : l'ABI Prim 7000 (tableau 2.11). Ce programme détermine les amorces en fonction de plusieurs critères :

1. La température de Melting est comprise entre 58 °C et 60 °C
2. La longueur de l'amplicon fait entre 50 et 150 paires de bases
3. Il faut maximum 2 G/C dans les 5 derniers nucléotides
4. Quatre répétitions d'une même base sont également évitées

Afin d'obtenir un rendement maximal, nous testons pour chaque amorce (sens et anti-sens) 3 concentrations différentes (50 nM, 300 nM et 900 nM), ce qui offre 9 possibilités de couples d'amorces. Le meilleur couple permettra une amplification avec le Ct le plus bas, sans amplification aspécifique (due notamment aux dimères d'amorces) tout en ayant un plateau d'amplification élevé (moins de limitation en matériel).

Un premier mix d'ADN est préparé (voir tableau 2.12). Pour chaque concentration testée, il est nécessaire de faire un blanc. Un deuxième mix est alors préparé : le Mix blanc (tableau 2.13)

Dans chaque puits, nous ajoutons 20 µl du mix ADN ou blanc ainsi que 2,5 µl d'amorce sens et 2,5 µl d'amorce anti-sens 10 X plus concentrées que la concentration finale.

2. Comparaison des efficacités de PCR

Après avoir mis au point les concentrations d'amorce, il faut comparer les efficacités de PCR entre le gène d'intérêt et le gène de maintenance (GAPDH). Pour chaque gène étudié, un Master mix est réalisé (tableau 2.15). 20 µl de Master mix sont placés dans chaque tube ainsi que 5 µl d'ADNc dilué de 10 à 100.000 X. Pour les blancs, on remplace les 5 µl d'ADN par de l'eau. Les tubes sont fermés avec des capuchons et spinés pour ramener les 25 µl au fond des tubes. Les comparaisons d'efficacité sont analysées sur Excel. Si les efficacités du gène d'intérêt et du gène de maintenance sont comparables, nous pouvons alors réaliser la PCR en temps réel sur ces gènes en condition contrôle et test.

3. Real-Time PCR :

Les amorces (sens et anti-sens) ont été préalablement sélectionnées pour obtenir un rendement de PCR optimal. Les concentrations stock des amorces sont 10 fois plus concentrées que dans le tableau 2.14 reprenant les concentrations finales utilisées pour chaque ADNc. Pour chaque gène étudié, un Master mix est réalisé (tableau 2.15). 20 µl de Master mix sont placés dans chaque tube ainsi que 5 µl d'ADNc dilué 100 X. Pour les blancs, on remplace les 5 µl d'ADN par de l'eau. Les tubes sont fermés avec des capuchons et spinés pour ramener les 25 µl au fond des tubes. Le programme informatique « SDS Software » (ABI) permet de prendre les mesures de fluorescence à chaque cycle. De plus, une courbe de dissociation permet de s'assurer de la spécificité de l'amplification PCR. Les résultats sont ensuite traités sur Excel et se calculent selon les delta Ct (si les courbes standards sont parallèles) ou selon les courbes standards si celles-ci ne sont pas parallèles. Les différents calculs seront expliqués dans les résultats.

6. Transfection des THP-1 par électroporation :

1) Principe :

La transfection des THP-1 avec de l'ADN exogène se fait par électroporation : un choc électrique va déstabiliser les membranes cellulaire et nucléaire et permettre l'entrée de l'ADN au niveau du noyau. Durant ces tests préliminaires, nous utiliserons deux plasmides contrôle : pCMV β (fig. 2.6) pour mesurer le signal de transfection et E-GFP-NI (fig. 2.7) pour connaître l'efficacité de transfection.

2) Matériels :

- Cell line optimisation Kit (tableau 2.16) (Amaxa)
- Nucleofector (Amaxa)
- Plaque 12 et 24 puits (Costar)
- Plaque 96 puits (Greiner Bio-one)
- RPMI complet (voir tableau 2.1)
- Plasmide pc β (Clontech)
- Plasmide E-GFP-NI (Clontech)
- Étuve à 37°C / 5 % de CO₂ (Heraeus Sepatech)
- Centrifugeuse (Heraeus)
- Microscope à fluorescence (Leica)
- M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce)
- Bromure d'éthidium (Sigma)
- Acridine orange (Sigma)
- ONPG (o-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside) (Acros)

3) Méthodes :

1. Optimisation des programmes de nucléofection :

Pour chaque programme testé, on travaille avec 1.10^6 cellules. Après comptage, le nombre de cellules voulu est centrifugé 7 min à 1.000 rpm et resuspendu dans la solution R + le supplément (tableau 2.16) à raison de 100 μ l par million de cellules. Puis, 2,5 μ g de pCMV β sont mélangés à 100 μ l de suspension cellulaire et déposés dans une cuvette. Celle-ci est ensuite placée dans le Nucleofector sur lequel le programme a été préalablement sélectionné. Après électroporation, 500 μ l de RPMI complet sont ajoutés dans la cuvette et le tout est transféré au moyen de pipettes spécifiques dans une plaque 12 puits possédant déjà 1,5 ml de RPMI complet par puits. Les cellules sont incubées à 37 °C pendant 24 h (fig 2.8).

Suite à cette incubation, 1,5 ml de suspension cellulaire correspondant à chaque condition sont prélevés et centrifugés 5 min à 2.000 rpm. Chaque culot est resuspendu dans 100 μ l de M-PER et placé dans une plaque 24 puits sous agitation pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, 75 μ l des 100 μ l de lysat cellulaire sont mélangés à 75 μ l d'ONPG et placés dans une plaque 96 puits à 37 °C. La β -galactosidase va métaboliser l'ONPG en o-

nitrophénol qui peut être détecté par spectrophotométrie de par la coloration jaune qu'il donne au lysat. Les DO à 405 nm sont mesurées après 30 min, 1 h et 3 h.

2. Test de cytotoxicité :

Ce test nous permet d'évaluer le taux de mortalité des cellules 24 h après la transfection. Une goutte de suspension cellulaire et une goutte de bromure d'éthidium-Acridine orange sont mises en contact et directement visualisées au microscope à fluorescence. Cette solution est composée de

- 50 mg de bromure d'éthidium
- 15 mg d'acridine orange
- dans 50 ml 2 % d'EtOH

L'ensemble est dilué 100 X dans du PBS et conservé à 4°C.

Le bromure d'éthidium colore le noyau des cellules mortes en orange alors que l'Acridine orange colore le noyau des cellules vivantes en vert.

$$\text{Pourcentage de survie} = \frac{\text{nbre de cellules vertes}}{\text{nbre total de cellules}} \times 100$$

3. Optimisation de la transfection :

En utilisant les programmes présentant les meilleurs résultats β -galactosidase, nous mesurons le taux de transfection après 24 et 48 h. Les cellules sont transfectées avec le plasmide E-GFP-N1. La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine qui émet de la fluorescence verte quand celle-ci est excitée par une lumière bleue. Nous pourrions donc différencier les cellules transfectées des autres cellules en les illuminant avec une lumière bleue. Les cellules transfectées apparaissant en vert. La méthode utilisée est identique que pour le point 1.

$$\text{L'efficience de transfection} = \frac{\text{nbre de cellules vertes}}{\text{nbre totales de cellules}} \times 100$$

4. Optimisation du programme U01 :

Nous avons testé différentes concentrations de plasmides pCMV β et E-GFP-N1 à transfecter ainsi que la densité cellulaire de départ. Nous avons testé les concentrations 1 μ g, 2,5 μ g et 5 μ g de plasmide. Pour les densités cellulaires, nous avons testé $0,5 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^6$ cellules. La méthode reste celle décrite dans la figure 2.8.

I. Extraction des LDL et bioactivité :

1. Extraction des LDL :

Cette technique occupe une part importante de ce mémoire car elle est à la base des différentes manipulations d'études de profils d'expression génique, puisque l'objectif de ce travail est de voir dans quelle mesure les LDL natives peuvent affecter le comportement des monocytes.

L'extraction des LDL a été réalisée comme il a été décrit dans le chapitre des Matériels et Méthodes (point II). Nous travaillons à partir de 70 ml d'un pool de sérum provenant du CHR (Centre Hospitalier Régional) de Namur. Après la première ultracentrifugation, nous récoltons plus ou moins 9 ml de lipoprotéines. De ces 9 ml, nous obtenons, après ultracentrifugation, 3 ml de LDL. Les LDL sont alors dialysées contre 8 X 500 ml de tampon de dialyse, puis, filtrées et conservées à 4°C. Dans ces conditions, elles restent stables plus ou moins 2 semaines. Le dosage par Bradford ne nécessite pas de conditions stériles. Nous réalisons tout d'abord une courbe d'étalonnage qui reprend les DO (Densité Optique) mesurées à 595 nm en fonction des concentrations ($\mu\text{g/ml}$) de la BSA (fig. 3.1). Puis, nous calculons la concentration en protéines des LDL à partir de l'équation de cette courbe d'étalonnage connue. Pour cela nous utilisons, pour chaque DO mesurée, la formule :

$x = ((y-b)/a) * D$ où x = la concentration de l'échantillon

y = la DO mesurée à 595 nm

a = la pente de la droite

b = l'ordonnée à l'origine

D = la dilution de l'échantillon (de 40 à 1280 X)

Ensuite nous calculons la moyenne des valeurs obtenues. Le dosage a été réalisé sur deux échantillons pour lesquels nous obtenons les concentrations suivantes : 2380,4 $\mu\text{g/ml}$ et 2249,3 $\mu\text{g/ml}$. La concentration finale estimée est de 2315 $\mu\text{g/ml}$ de protéines.

Pour confirmer l'état natif des LDL extraites, nous avons voulu les visualiser sur un gel d'agarose 1% coloré au Noir Soudan. Pour cela, nous faisons migrer 15 μg de LDL natives ainsi que 15 μg de LDL préalablement oxydées pendant 24 H avec 10 μM de CuSO_4 . De par leur charge plus négative, les LDL oxydées doivent migrer plus loin que les LDL natives sur un gel soumis à une différence de potentiel de 50 mV. Cette expérience a été réalisée 2 fois, mais nous n'avons jamais obtenu de différence dans les profils électrophorétiques des LDL natives et oxydées. L'hypothèse la plus probable est la non-oxydation des LDL à cause d'une erreur de protocole dans l'oxydation des LDL. Dans le cadre de ce mémoire, il est très peu probable que les LDL aient été déjà oxydées lors de leur utilisation pour les expériences d'établissement de profils d'expression génique étant donné leur emploi dans les 2 jours après extraction et leur conservation dans un tampon contenant 0,01 % d'EDTA.

2. Le chimotactisme :

Avant d'établir les profils d'expression génique de cellules THP-1 stimulées ou non avec les LDL, nous avons testé la bioactivité des LDL par un test fonctionnel qui est celui du chimotactisme. Le chimotactisme est une méthode qui nous permet d'estimer la capacité de migration des monocytes en réponse à un gradient de MCP-1 en présence ou non de LDL (Matériels et Méthodes, point III). Les cellules THP-1 sont stimulées avec 50 µg/ml de LDL pendant 24 H.

La mesure de la fluorescence se fait à 520 nm. En comparant la fluorescence émise par la calcéine dans les conditions contrôle et LDL, nous pouvons constater que la fluorescence est beaucoup plus élevée (3,85 X) quand les cellules THP-1 sont mises en présence de LDL pendant 24 H (fig. 3.2 a).

Dans le test, nous avons deux conditions supplémentaires nommées 100 % et blanc. Les 100 % représentent un puits contenant 300.000 cellules marquées à la calcéine. Les blancs représentent également 300.000 cellules mais non marquées à la calcéine. Pour chacune de ces deux conditions, le test de migration n'est pas effectué. Les 100% nous donnent simplement la fluorescence maximale émise par l'ensemble des cellules utilisées dans le test, et les blancs l'influence des cellules elles-mêmes sur la fluorescence basale. Nous avons voulu savoir à quel nombre de cellules THP-1 correspondaient les valeurs de fluorescence données à la figure 3.2 a. Dans ce but, nous établissons également une courbe d'étalonnage pour le test Boyden, qui reprend la fluorescence mesurée à 595 nm en fonction du nombre de cellules des 100% dilués de 2 en 2, et corrigés par les blancs. L'équation de la droite obtenue nous permet de calculer le nombre de THP-1 ayant migré en condition contrôle et LDL à partir de la fluorescence mesurée à 520 nm (fig. 3.2 b) : $x = (y - b)/a$. Dans notre cas, $x = (y + 751,85)/0,3136$.

Dans la condition LDL, nous trouvons que 21.786 monocytes (plus ou moins 7 % des cellules engagées dans le test) ont migré alors que dans la condition contrôle, seulement 7.432 monocytes (plus ou moins 2,5 % des cellules) ont migré (fig.3.2 c). Il y a donc une plus forte migration des monocytes en présence de LDL. Nous constatons que le pourcentage de monocytes ayant traversé la membrane est assez faible. Nous pouvons penser que durant les deux heures de migration, toutes les cellules n'ont pas eu l'occasion de passer au travers des pores et qu'une grande partie y reste « coincée ». Si nous récupérions, en plus, les monocytes restés accrochés à la membrane, nous en aurions probablement beaucoup plus. L'expérience a été répétée deux fois, avec des résultats similaires (résultats non montrés). En présence de LDL, on observe jusqu'à 30 fois plus de monocytes ayant migré. Dans l'expérience de la figure 3.2, l'induction semble alors plus faible, mais cela est dû à l'adhérence basale plus élevée des monocytes.

Nous pouvons quand même conclure que les LDL natives augmentent considérablement la réponse chimotactique des cellules THP-1 au MCP-1. Le MCP-1 est une chimokine qui se lie aux récepteurs CCR2 situés en membrane des monocytes. Elle active le monocyte et contribue au phénomène de diapédèse. Dans le cadre de l'athérosclérose, cette activation a des conséquences importantes puisque, en présence de concentrations élevées en LDL natives dans le sang, les monocytes activés traverseront la barrière endothéliale par le processus de diapédèse pour se retrouver dans l'intima où ils se

différencieront en macrophages, et pour y déclencher tous les mécanismes précoces de formation de la plaque athéromateuse. Han et Quehenberg (2000) ont également observé une augmentation de la réponse chimotactique des monocytes quand ceux-ci sont stimulés avec 5, 50 ou 500 µg/ml de LDL. Des résultats semblables aux nôtres ont également été observés par Klouche et son équipe (1999) lors d'une étude sur l'effet des LDL modifiées et natives sur l'adhérence et la migration des monocytes et des lymphocyte T. Nos résultats concordent donc bien avec ce qui est trouvé dans la littérature. Étant donné ces effets des LDL sur les monocytes, nous avons voulu analyser si les LDL pouvaient également modifier l'expression génique de ces cellules.

II. Étude des profils d'expression génique sur damiers à ADN:

1. La stimulation des cellules THP-1 :

Comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthode au point IV.1, nous stimulons les cellules THP-1 (repiquées la veille à 6 millions de cellules dans une T75) avec le LPS, le PMA et les LDL. Nous avons d'abord réalisé des stimulations de 6 h au LPS avec les contrôles correspondants, puis des stimulations de 24 h avec le PMA et pour finir une cinétique de temps (4 H, 6 H, 12 H et 24 H) pour les stimulations avec les LDL.

Le LPS sera utilisé comme système de référence. Les effets du LPS sur les monocytes sont bien connus, les mécanismes de transduction du signal bien décrits et les gènes induits bien caractérisés (voir point IV.2 de l'introduction). Le temps 6 H a été choisi sur base des résultats de Sébastien Toffoli (2002). Durant son mémoire, il avait testé différents temps de stimulation au LPS sur les THP-1 : 6 H, 12 H et 24 H. C'est pour le temps 6 H que les effets étaient les plus marqués. Nous avons donc repris ce temps de stimulation pour nos expériences.

Avec le PMA, nous stimulons les monocytes pendant 24 H. Le PMA est utilisé *in vitro* pour la différenciation du monocyte en macrophage. Ce modèle est couramment utilisé dans les études sur l'athérosclérose.

En ce qui concerne les LDL, nous établirons une cinétique de temps car nous avons encore très peu d'informations sur des effets potentiels des LDL natives sur les monocytes. Les conditions de stimulation sont reprises au point III.1 dans le tableau 2.4 du chapitre Matériels et Méthodes.

2. L'extraction d'ARNm et la transcription inverse :

L'ARNm est extrait selon le mode opératoire décrit dans le point III.2 du chapitre Matériels et Méthodes. Chaque extraction se fait sur des cellules contrôle et des cellules stimulées au LPS, au PMA ou encore aux LDL.

La quantité d'ARNm extraite est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La DO à 280 nm est aussi une mesure importante, car une quantité de protéines trop importantes pourrait interférer avec la transcription inverse par la présence d'inhibiteurs de RT, par exemple. Le rapport entre la quantité d'ARN et la quantité de protéines, ou ratio

(260/280), doit être le plus proche possible de 2 et nous permet d'évaluer la pureté de nos échantillons. D'une manière générale, nous avons toujours obtenu des ratios compris entre 1,6 et 1,9. Lors des premières extractions, nous obtenions toujours des ratios de plus ou moins 1,6. Lors des dernières manipulations, nous avons obtenu de meilleurs résultats avec des ratios de l'ordre de 1,9 ce qui reflète un ARNm très pur. Cette évolution positive du ratio dépend certainement du savoir faire acquis au long de ce mémoire. Signalons en outre que pour les expériences d'hybridation, les ratios de 1,6 restent acceptables. Les résultats obtenus au cours de ce mémoire sont représentés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des différentes extractions réalisées et du nombre de RT réalisées : Pour chaque condition, plusieurs extractions ont été réalisées au départ de 6.10^6 cellules. Les concentrations d'ARNm sont exprimées en ng/ μ l. À partir de ces résultats, nous calculons le nombre de RT que nous pouvons effectuer à partir d'une seule extraction.

| | CTL | PMA | LPS | LDL |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Concentration finale en ARNm | 290 à 500 ng/ μ l | 130 à 170 ng/ μ l | 185 à 300 ng/ μ l | 250 à 640ng/ μ l |
| Quantité d'ARNm | 2,3 à 4 μ g | 1 à 1,4 μ g | 1,5 à 2,5 μ g | 2 à 5,1 μ g |
| Nombre de RT (0,5 μg d'ARNm pour 1 RT) | 4 à 8 | 2 | 3 à 5 | 4 à 10 |
| Ratio (260/280) | 1,5 à 1,75 | 1,35 à 1,45 | 1,5 à 1,7 | 1,5 à 1,9 |

Nous obtenons, pour les 2 contrôles positifs, des concentrations de 185 à 300 ng/ μ l d'ARNm pour la condition LPS et de 130 à 170 ng/ μ l pour la condition PMA. Dans les 2 cas, les quantités obtenues sont peu variables, mais relativement faibles par rapport au contrôle pour lequel nous obtenons en moyenne 290 à 500 ng/ μ l (voir tableau 3.1). En effet, lors de l'extraction, nous constatons déjà que nous possédions moins de matériel que pour des autres conditions. En effet, après stimulation au PMA, et en moindre mesure avec le LPS, les cellules adhèrent au support et ne prolifèrent plus autant que les cellules contrôles. En parallèle, nous observons aussi des ratios systématiquement plus bas pour la condition PMA, ce qui peut poser problème lors des RT (voir plus tard). Pour la condition LDL, les concentrations d'ARNm peuvent être fortement variables, car nous travaillons avec une cinétique de temps, c'est-à-dire, une stimulation de 4 H, 6 H, 12 H et 24 H. Il est donc logique d'obtenir des concentrations croissantes d'ARNm selon la durée de stimulation. À partir de cette concentration en ARNm connue, nous pouvons calculer la quantité d'ARNm récolté pour la T75 de départ : en fin d'extraction d'ARNm, nous resuspendons le culot d'ARNm dans 10 μ l d'eau RNase free. Ces 10 μ l correspondent aux 6.10^6 cellules de départ. Comme décrit dans le point 3.2 du chapitre Matériels et Méthodes, 2 μ l sont utilisés pour la quantification, il nous reste donc 8 μ l final. La quantité d'ARNm obtenue est calculée comme suit : la concentration (ng/ μ l) est multipliée par 8.

La transcription inverse est réalisée selon la méthode décrite dans le point III.3 du chapitre Matériels et Méthodes. Elle se fait à partir de 0,5 μ g d'ARNm. Il est nécessaire

d'utiliser une même quantité d'ARNm pour la transcription inverse des cellules contrôles et des cellules tests. Cela nous permettra de comparer, par la suite, l'hybridation des ADNc sur les micro-damiers. Les légères différences qui subsisteront, notamment à cause d'erreurs de chargement dues au pipetage ou à la quantification, seront corrigées par une normalisation avec des gènes de maintenance. Il est cependant évident que des erreurs de chargement trop importantes ne pourront être corrigées par cette normalisation. Nous pouvons généralement réaliser plusieurs RT à partir d'une même extraction d'ARNm (tableau 3.1). À nouveau, ce nombre peut être fort variable et dépend directement de la quantité d'ARNm récoltée en fin d'extraction. De plus un mix de standards internes est ajouté lors de la RT pour permettre de normaliser les gènes plus ou moins exprimés et de voir si la RT s'est correctement déroulée.

3. Présentation générale des damiers à ADN utilisés :

3.1 Hybridation, Révélation et Quantification :

L'hybridation :

L'hybridation des ADNc biotinylés a été réalisée sur 3 types de damiers :

- A. Le damier prototype réalisé par Sébastien Toffoli lors de son mémoire l'an dernier (Toffoli, 2002).
- B. Le CD généraliste de chez EAT (Eppendorf Array Technology).
- C. La GeneralChip, également, de chez EAT.

Le mode opératoire de cette étape est décrit dans le point III.4.1 du chapitre Matériels et Méthodes. L'hybridation se faisait, généralement, dans les thermomixeurs, pour la GeneralChip et dans un four à hybridation pour le damier prototype et le CD Généraliste. Dans le cas de l'hybridation CTL-PMA, nous avons hybridé, sur la GeneralChip dans le thermomixeur et dans le four à hybridation pour confirmer s'il existait bien des différences au niveau de la qualité finale du damier. Le thermomixeur, contrairement, au four à hybridation, permet une agitation des lames.

La révélation :

Pour le damier prototype et la GeneralChip, la révélation des ADNc se fera en fluorescence. Cette étape est décrite au point III.4.2 du chapitre Matériels et Méthodes. Pour le CD Généraliste, la révélation se fait en colorimétrie, dont les différences techniques seront décrites plus tard.

La quantification :

L'étape de quantification est décrite dans le point III.4.3 du chapitre Matériels et Méthodes. Dans tous les damiers, nous devons retrouver certains spots particuliers qui nous indiqueront si l'hybridation s'est faite correctement et si le spotting s'est bien

déroulé. Parmi ces spots, on distingue des **contrôles de fixation** : ceux-ci sont composés d'une séquence d'ADN biotinylée spottée telle quelle sur le damier et nous informent sur le bon déroulement du spotting. Ensuite, nous retrouvons des **contrôles d'hybridation positifs**. Ceux-ci sont constitués de trappeurs non biotinylés. Des séquences anti-complémentaires seront ajoutées au mix d'hybridation (voir tableau 2.10 des Matériels et Méthodes). Ces contrôles permettent de vérifier si l'hybridation se déroule correctement. Nous retrouvons également des **contrôles d'hybridation négatifs**. Ce sont des trappeurs sur lesquels aucun ADN ne doit s'hybrider. Ils permettent de vérifier la spécificité des cibles, mais aussi l'absence de contamination pendant le spotting. Tous ces contrôles sont des séquences d'ADN non humain.

A ces différents contrôles, s'ajoutent des **standards internes** qui permettent la normalisation des résultats lors de la quantification et permettent de s'assurer d'un bon déroulement de la transcription inverse.

Après révélation des ADNc hybridés, tous les contrôles donnent des spots positifs sauf le contrôle d'hybridation négatif. C'est ce que nous avons observé dans tous nos damiers. Avant de présenter nos résultats, nous allons décrire les quelques difficultés rencontrées.

3.2 Difficultés rencontrées :

En règle générale, l'hybridation est une technique très délicate à réaliser. Plusieurs problèmes ont été rencontrés au cours de ce mémoire. En début d'hybridation, il est nécessaire de recouvrir le damier avec un couvre-objet. Lors de cette manipulation, des bulles peuvent se former et empêcher l'hybridation de se dérouler correctement. Ces zones sont alors inutilisables suite à la présence d'une forte fluorescence.

Les damiers sont ensuite placés durant la nuit dans un thermomixeur ou dans un four (pour le damier prototype et le CD généraliste pour lesquels des thermomixeurs n'étaient pas encore adaptés). Le thermomixeur est plus avantageux car il agite les lames tout en les chauffant et donc les bulles peuvent voyager. Il offre également un avantage supplémentaire dans le sens où le mix d'hybridation est continuellement mélangé, ce qui permet à tous les ADNc de rentrer en contact avec la totalité des trappeurs. Malgré l'utilisation de thermomixeurs, des artéfacts peuvent encore se produire, rendant les damiers non quantifiables (fig. 3.3). Cette figure nous montre bien que dans le damier de gauche (A) (four à hybridation), nous trouvons une zone où une bulle s'est formée et rend cette partie du damier non quantifiable. On ne voit pas de bulle dans le damier de droite (B) (thermomixeur), mais par contre, nous y trouvons une tache fluorescente centrale qui ne provient pas de l'hybridation dans le thermomixeur. Il est possible, qu'au cours de la manipulation, nous ayons touché le damier, ce qui suffit pour donner une tache fluorescente.

Habituellement, les couvre-objets utilisés sont souples. Durant ce mémoire, ceux-ci n'étaient plus disponibles et nous avons donc dû utiliser des couvre-objet plus rigides. L'inconvénient majeur étant que ces couvre-objet sont beaucoup plus difficiles à manipuler et la formation de bulles plus fréquente. De plus, sur chaque lame sont spottés deux damiers, chacun recouvert par un couvre-objet rigide. L'inconvénient est qu'un des couvre-objet se superposait à l'autre et était donc légèrement soulevé lors de l'hybridation permettant une évaporation de la solution d'hybridation sur ce damier. Les

sels contenus dans le mix sont finalement plus concentrés, précipitent et rendent le damier non quantifiable (fig. 3.4).

Pour le CD Généraliste, plusieurs hybridations ont été réalisées sur ce type de support mais la majorité des CD ont été perdus, car ils n'étaient plus reconnus par l'ordinateur suite à un problème de gravure des informations sur le CD. Les résultats d'hybridation d'un des CD ont pu être récupérés, pour lesquels nous avons procédé à la quantification et l'analyse. Le problème des couvre-objets rigides et de la formation de bulles, reste aussi d'application pour les CD. L'ensemble de ces problèmes nous a obligés à abandonner ce projet. Nous avons donc décidé d'effectuer les autres hybridations sur la GeneralChip.

3.3 Résultats obtenus avec les différents damiers:

3.3.1 Damier prototype :

Hybridation :

Les premiers essais ont été réalisés sur un damier prototype, lui-même élaboré au laboratoire et comportant 17 sondes de capture prévues pour suivre l'expression de gènes encodant les protéines mentionnées dans la figure 3.5. Ces protéines sont impliquées, entre autres dans la réponse pro-inflammatoire et de la coagulation. Tous les gènes sont représentés par 3 spots groupés (fig. 3.5). Deux comparaisons ont été testées sur ce damier : CTL-PMA 24 H et CTL-LDL 4 H. Ce damier a donc surtout été utilisé pour apprendre la technique d'hybridation.

Révélation et Quantification :

La révélation se fait grâce à des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, la Cyanine 3. Cette étape est expliquée dans le point III.4.2 du chapitre Matériels et Méthodes. La détection se fait par un scanner confocal. Généralement, nous avons scanné les lames à trois gains différents ce qui nous permet d'analyser tant les gènes fortement exprimés (β -actine, p.e.) que ceux faiblement exprimés (CD36, p.e.). La quantification avec le programme Imagen permet de déterminer la moyenne des intensités de chaque spot. Les valeurs obtenues vont permettre de déterminer, après normalisation, la variation d'expression, de gènes d'une situation test par rapport à une situation contrôle.

Comparaison CTL-PMA 24 H :

Les damiers sont scannés aux gains 80, 70 et 60 (fig. 3.6). On remarque que le bruit de fond des damiers contrôles est très faible alors que celui des damiers PMA est déjà assez important au gain 80. Aucune bulle n'est visible ; on trouve néanmoins une tache fluorescente dans la partie supérieure gauche du damier PMA, qui ne gêne pas l'analyse. Cela est probablement dû à la présence d'un film de particules sur le damier du côté du bord fritté de la lame de verre, alors utilisée pour l'hybridation.

Nous avons entrepris l'analyse quantitative de ce damier. Nous observons une diminution de 3 fois de l'expression du gène CCR2A qui encode un récepteur situé en membrane des monocytes. Ce récepteur lie le MCP-1.

Comparaison CTL-LDL 4H :

Les damiers sont scannés aux gains 85, 70 et 55 (fig 3.7). Ils présentent un bruit de fond négligeable. Aucune bulle n'est présente. On constate juste un fin filet de fluorescence dans la partie inférieure droite du damier LDL.

Une analyse quantitative des damiers a été réalisée. Nous observons une augmentation de l'expression des gènes encodant la THBD et le TF (Facteur Tissulaire) de 2 fois. Ces résultats sont assez étonnants étant donné que ces 2 protéines interviennent dans la cascade de coagulation de manière opposée. La THBD est une molécule anti-coagulante, c'est-à-dire qui assure une bonne fluidité du sang. Le TF est, par contre, une molécule pro-coagulante qui active la voie extrinsèque de la cascade de coagulation et favorise la formation du caillot sanguin suite à une blessure vasculaire (voir Figure 1.9 de l'Introduction) .

Ce damier a surtout été utilisé pour se faire la main et non comme outil principal de l'étude des profils d'expression génique. De plus le nombre de gènes étant fortement limité sur ce damier pour ce type d'étude, nous avons alors utilisé le CD Généraliste en cours de mise au point chez EAT. Le CD Généraliste comporte les mêmes 202 sondes de capture que le damier GeneralChip développé également chez EAT.

3.3.2 Le CD Généraliste :

Dans un premier temps, nous avons utilisé le CD Généraliste, car le modèle de cellules THP-1 se prêtait bien à une étude de profil d'expression génique dans le cadre d'une validation de ce support.

Ce damier porte 202 sondes de capture correspondant à 202 gènes repris dans l'annexe 1 et qui sont représentés par un seul spot (fig. 3.8). La nouveauté est que ce damier est spotté sur un CD et non plus sur une lame de verre qui était, jusqu'à présent, le support habituellement utilisé. Cela apporte différents avantages :

- Plusieurs damiers sont spottés sur un même CD, il est donc possible de réaliser différentes expériences sur le même support. Un CD peut comporter jusqu'à 10 damiers.
- Toutes les informations sur les gènes spottés, les résultats des hybridations et les quantifications sont gravées sur le CD.

Nous avons hybridé les conditions CTL-LPS 6 H (fig. 3.9). La révélation ne se fait pas en fluorescence mais en colorimétrie, par une révélation à l'argent. Nous utilisons des anticorps anti-biotine couplés à l'or qui reconnaîtront les dCTP biotinylés. Ensuite, nous ajoutons la solution A mélangée à la solution B du kit de détection à l'argent (EAT). Les sels d'argent vont précipiter autour des particules d'or, et le spot apparaîtra alors dans des

nuances de gris. Au plus le spot sera foncé, au plus la quantité d'ADNc hybridé est importante. Trois gènes induits après stimulation au LPS ont été fléchés : l'IL1- β , l'IL8 et la SOD2. Pour ces trois gènes, nous pouvons observer des spots beaucoup plus foncés dans les damiers LPS.

Une analyse quantitative de ces damiers a été entreprise. Elle révèle qu'après une stimulation de 6 H avec 10 μ g/ml de LPS, plusieurs gènes sont fortement induits (fig. 3.10). Signalons, en particulier, les gènes encodant la chémokine IL-8 (723 X), le facteur de transcription MDM2 (86 X), les cytokines pro-inflammatoires IL1- β (70 X) et TNF- α (9 X) ou encore l'enzyme anti-oxydante SOD2 (67 X).

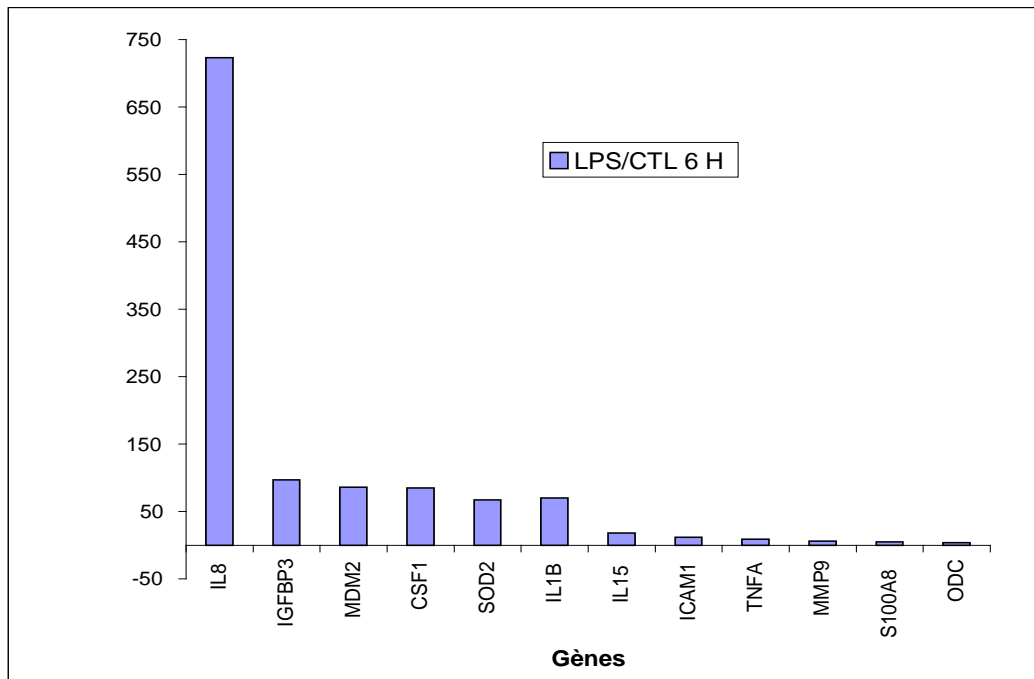


Figure 3.10 : Principaux gènes induits par le LPS dans les cellules THP-1 après 6 H de stimulation : Ces résultats découlent d'une analyse quantitative du CD Généraliste illustré à la figure 3.9.

Au cours de son mémoire l'an passé, Sébastien Toffoli avait démontré pour l'IL1- β et le TNF α une augmentation d'expression génique de, respectivement 56 fois et 12 fois lorsque les THP-1 étaient stimulés pendant 6 H avec 10 μ g/ml de LPS. Nous observons donc une concordance pour ces deux gènes entre le damier prototype et le CD Généraliste.

Ces résultats confirment bien l'intérêt de l'utilisation de damiers à moyenne densité. Le nombre de gènes pris en compte est beaucoup plus important que sur un damier à faible densité, comme le damier prototype. Effectivement, plusieurs gènes sont induits dans la condition LPS 6 H, dont certains moins attendus comme le gène HMOX (encodant l'hème oxygénase) ou le gène S100A8 (encodant la S100 calcium binding protein A8).

Nous retrouvons différentes classes de gènes induits par le LPS : gènes encodant des cytokines (IL1- β et IL-8 par exemple), des molécules d'adhérence comme ICAM-1 ou des protéases comme la MMP9. Ces résultats seront discutés plus longuement dans la discussion générale au point 3.3.4.

3.3.3 La GeneralChip :

Ce damier comporte les mêmes sondes de capture que le CD Généraliste, et correspondent aux 202 gènes repris en annexe 1. La grande différence, outre, le support du damier qui, dans ce cas-ci est une lame de verre, réside dans la disposition des sondes de capture sur le damier. Tous les gènes sont représentés par 3 spots, mais les triplicats ne sont pas disposés au même endroit sur le damier (voir fig. 2.4 du chapitre Matériels et Méthodes), ce qui signifie que s'il y a un problème dans une zone (bulle, évaporation de la solution d'hybridation, bruit de fond élevé,...), les triplicats ne sont pas touchés de la même manière et l'analyse du damier reste donc en général réalisable. Les 3 conditions ont été testées sur ce damier : LPS, PMA et LDL avec les CTL correspondants.

Pour chacune de ces conditions, l'hybridation a été réalisée et les damiers obtenus scannés à 4 gains différents.

Comparaison CTL-LPS 6 H :

L'hybridation de ces 2 damiers s'est déroulée dans le thermomixeur, et ils ont été scannés aux gains 100, 80 et 60 (fig. 3.11 et 3.12). On remarque bien les 3 zones du damier représentant l'ensemble des triplicats. Ceux-ci doivent présenter la même intensité de spot : c'est le cas dans ce damier. Par exemple, les contrôles d'hybridation sont tous allumés et les triplicats possèdent à première vue la même intensité. Les contrôles d'hybridation négatifs, par contre, ne sont pas allumés. Pour les 2 damiers, on constate la présence d'une tache laissée par une goutte d'eau dans la partie inférieure droite du damier qui est apparue lors du séchage des lames. Celles-ci n'ont pas été séchées au moyen de la centrifugeuse (voir point III.4.2 du chapitre Matériels et Méthodes) mais ont été séchées à l'air libre. Cette tache touche 2 zones (2 et 3), mais ne gêne pas trop l'analyse des résultats (figure 3.11). Deux gènes clairement induits (IL1- β et SOD2), en présence de LPS, ont été fléchés dans cette figure, pour montrer la différence d'intensité des spots entre la condition contrôle et la condition LPS, dans laquelle les spots sont beaucoup plus intenses que dans le damier contrôle. Cependant, une analyse quantitative est nécessaire et nous ne pouvons nous fier aux seules différences visuelles. La figure 3.12 nous montre les damiers CTL scannés aux 3 gains différents : 100, 80 et 60. Il est utile de scanner à différents gains pour pouvoir analyser l'ensemble des gènes induits, c'est-à-dire, à la fois, les gènes fortement et faiblement exprimés. Un spot saturé au gain 100, très intense, a été fléché (GAPDH). Au gain 80 ce même spot n'est plus saturé et peut donc être correctement analysé. Un second spot, moins saturé, est fléché au gain 100 (RAF1), mais il n'apparaît plus au gain 80. Il est donc important de scanner à différents gains.

Malgré les défauts illustrés à la figure 3.11, l'analyse quantitative a été entreprise sur ces damiers. Les résultats de cette analyse sont résumés à la figure 3.13

Nous observons une augmentation de l'expression génique de plusieurs gènes : p21, ICAM-1, SOD2 (SuperOxyde Dismutase 2), IL1- β et IGFBP5 (Insulin Growth Factor Binding Protein 5). L'expression de la plupart de ces gènes augmente de façon importante : IGFBP5 augmente de 133 fois par rapport à la situation contrôle, IL1- β augmente de 79 fois, SOD2 de 57 fois et ICAM-1 de 31 fois. La variation d'expression génique de p21 est beaucoup plus faible que pour les autres gènes, il est seulement 2 fois plus exprimé dans la condition LPS que dans la situation contrôle (fig. 3.13).

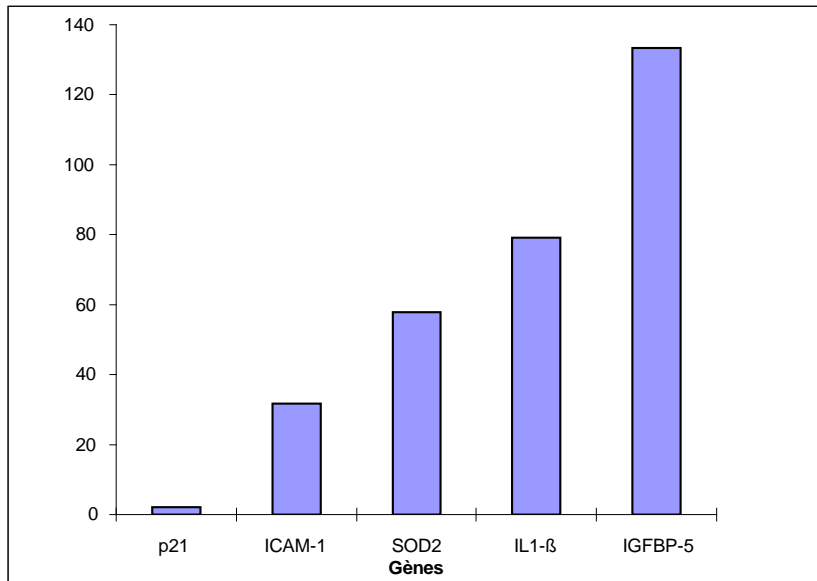


Figure 3.13 : Gènes dont l'expression génique varie après une stimulation de 6 h au LPS.

Nos résultats confirment donc ce qui avait déjà été observé pour l'IL1- β avec les damiers prototypes. La THBD n'est pas représentée sur la GeneralChip et en ce qui concerne le TNF α , nous n'observons curieusement pas de variation.

De plus, par rapport aux résultats de l'hybridation sur le CD Généraliste, nous retrouvons deux gènes identiques qui sont induits : l'IL1- β et la SOD2.

| Les gènes en commun : | Le CD Généraliste : | La GeneralChip : |
|-------------------------------|---------------------|------------------|
| <i>IL1-β</i> | 70 X | 79 X |
| <i>SOD2</i> | 67 X | 57 X |
| <i>ICAM-1</i> | 12 X | 31 X |

L'IL1- β est induit 70 X sur le CD Généraliste et 79 X sur la GeneralChip, ces résultats sont donc fort proches. Il est, par contre, étonnant de ne pas retrouver exactement les mêmes gènes induits dans les deux expériences étant donné que les deux damiers sont spottés avec les mêmes sondes de capture, et que les ADNc hybridés proviennent d'une

même RT et d'un même ARNm de départ. Une sensibilité différentielle des supports pourrait intervenir, le CD étant encore en cours de validation.

Comparaison CTL-PMA 24 H :

Pour cette expérience, nous avons réalisé 2 fois la même hybridation mais en utilisant le four et le thermomixeur pour l'hybridation (fig. 3.14). De plus, il est important de signaler que les ADNc hybridés sur ces damiers proviennent d'une même extraction d'ARNm et donc d'une même RT. Les damiers sont scannés aux gains 100, 80, 60 et 50. Pour les damiers PMA, nous constatons que le signal est systématiquement plus faible que pour les damiers CTL. Cela est peut-être dû au fait, que lors de l'extraction des ARNm, les ratios sont toujours plus bas pour les conditions PMA (voir tableau 3.1 des Résultats). Il y a donc plus de protéines par rapport à l'ARNm, et certaines peuvent inhiber la transcription inverse. Il est donc possible que la quantité d'ADNc obtenue soit plus faible pour la condition PMA. Dans ces conditions, nous ne prendrons en compte que les gènes dont l'expression est induite.

CTL 24 H four : Bruit de fond négligeable. Présence d'une tache laissée par une bulle dans la partie supérieure droite du damier, cette zone n'est donc pas analysable. Nous retrouvons aussi une petite tache fluorescente dans la partie inférieure droite du damier qui est sans doute due à la présence d'une poussière.

PMA 24 H four : Bruit de fond négligeable. Nous retrouvons également la même tache que sur le damier CTL 24 h four dans la partie supérieure droite du damier.

CTL 24 H thermomixeur : Bruit de fond négligeable. Tous les spots sont bien visibles à part au centre où nous trouvons une tache fluorescente. Nous avons sans doute touché le damier ou alors cela est dû à la précipitation des sels.

PMA 24 H thermomixeur : Présence de plusieurs taches fluorescentes probablement dues à la présence de bulles lors de l'hybridation.

Une analyse quantitative des damiers a été réalisée et la figure 3.15 reprend l'ensemble des gènes qui sont induits par le PMA :

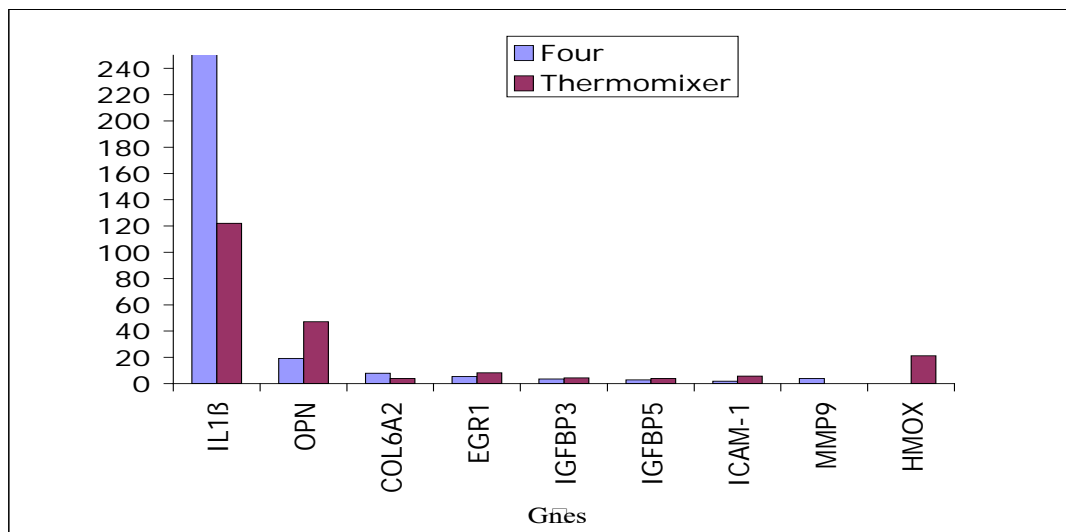


Figure 3.15 : Principaux gènes induits par le PMA dans les cellules THP-1 incubées 24 H avec cette molécule : L'hybridation s'est faite soit dans le four (colonnes claires), soit dans le thermomixeur (colonnes foncées).

Le tableau qui suit reprend l'ensemble de gènes induits en comparant les inductions pour les damiers hybridés en four ou en thermomixer :

| | PMA / CTL | |
|-------------|------------------|---------------------|
| | four | thermomixeur |
| IL1 β | 828 X | 122 X |
| OPN | 19 X | 47 X |
| COL6A | 7 X | 4 X |
| EGR1 | 5 X | 8 X |
| IGFBP3 | 3 X | 4 X |
| IGFBP 5 | 2,8 X | 21 X |
| ICAM-1 | 1,86 X | 5 X |
| MMP9 | 3 X | - |
| HMOX | - | 3 X |

Nous retrouvons, plus ou moins, les mêmes gènes induits dans les 2 conditions , four et thermomixeur à quelques exceptions près :

- HMOX que nous retrouvons uniquement dans les damiers « thermomixeur ».
- MMP 9 que nous retrouvons uniquement dans les damiers « four ».

L'induction est généralement plus importante dans les damiers hybridés en thermomixeur. Celui-ci permet une agitation des lames et la solution d'hybridation est continuellement mélangée, ce qui permet à tous les ADNc de bien entrer en contact avec l'ensemble des trappeurs. En général, il augmente la sensibilité de l'hybridation, ce qui nous a été confirmé par les chercheurs d'EAT.

Comparaison CTL-LDL (cinétique de temps) :

Comme les effets des LDL sur l'expression génique des cellules THP-1 sont peu connus, nous avons entrepris une étude d'expression génique au cours du temps. Les cellules ont donc été stimulées pendant 4 H, 6 H, 12 H et 24 H.

Les damiers obtenus pour les conditions 4 H et 6 H sont représentés à la figure 3.16.

CTL 4 H : Bruit de fond négligeable. Présence d'une tache fluorescente dans la partie inférieure du damier qui ne touche que quelques gènes. On trouve, également, 4 taches fluorescentes plus petites. Ces différentes taches ne gênent pas trop l'analyse des résultats.

LDL 4 H : Bruit de fond négligeable. Pas de présence de bulles ou de taches fluorescentes.

CTL 6 H : Bruit de fond négligeable. Pas de présence de bulles ou de taches fluorescentes.

LDL 6 H : Pour les damiers 6 H, l'ensemble des spots est systématiquement plus intense dans le damier LDL par rapport au damier CTL. Au cours de l'extraction d'ARNm, le culot s'était détaché après la dernière centrifugation (voir point IV.2 du chapitre

Matériels et Méthodes) et nous pensions avoir perdu une partie du culot. Il est possible, qu'en réalité, nous n'ayons pas perdu de matériel et que nous ayons sous-estimé la quantité d'ARNm récoltée. La quantité d'ADNc mise en jeu pour l'hybridation de ces deux conditions n'était donc pas identique. Les résultats de cette expérience seront donc considérés avec précaution.

Les damiers obtenus pour les conditions 12 et 24 H sont représentés dans la figure 3.17.

CTL 12 H :
LDL 12 H :
CTL 24 H :
LDL 24 H :

Bruit de fond négligeable. Pas de présence de taches fluorescentes ou de bulles

Dans les 3 zones du damier, les contrôles positifs d'hybridation sont tous allumés et les contrôles négatifs ne le sont pas.

Dans ces damiers, aucun spot n'a été fléché car l'induction des gènes n'est pas assez importante pour observer une grande différence d'intensité des spots entre les damiers CTL et LDL de manière visuelle. L'analyse quantitative montre, ici, toute son importance. Nous retrouvons de cette manière plusieurs gènes faiblement induits au cours de cette cinétique de temps. L'ensemble de ces gènes est représenté dans la figure 3.18 :

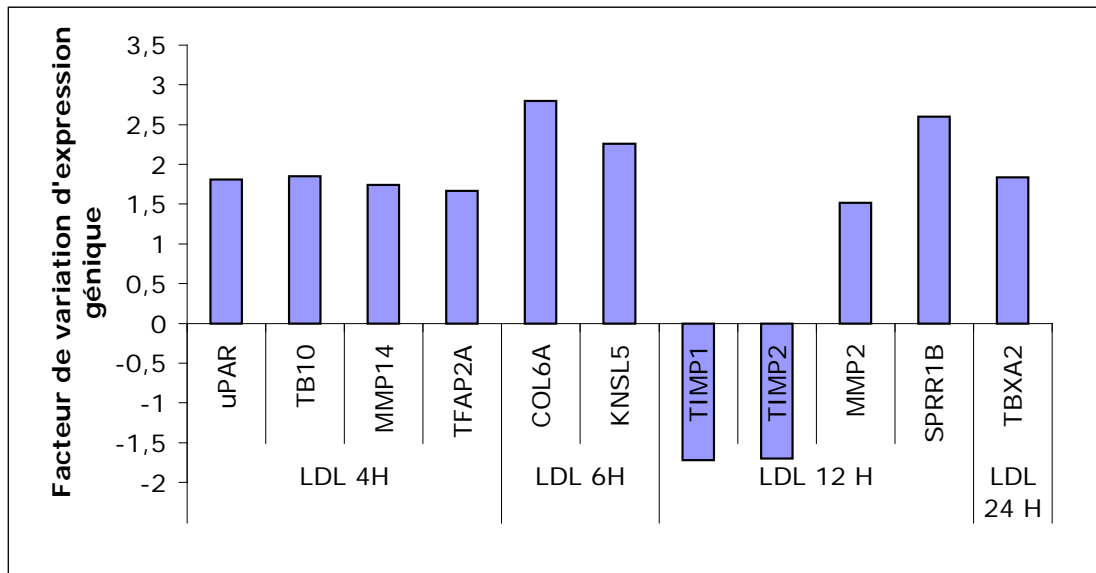


Figure 3.18 : Gènes dont la variation de l'expression génique varie après une stimulation des THP-1 avec les LDL selon une cinétique de temps (4 H, 6 H, 12 H et 24 H).

Les valeurs chiffrées de ces sous-/sur-expressions sont reprises dans le tableau ci-après.

| | Gènes induits | |
|-----------------|---------------|----------|
| LDL 4 H | uPAR | 1,81 X |
| | TB 10 | 1,85 X |
| | MMP 14 | 1,74 X |
| | TFAP 2A | 1,67 X |
| LDL 6 H | KNSL 5 | 2,26 X |
| | COL 6A | 2,8 X |
| LDL 12 H | TIMP 1 | - 1,72 X |
| | MMP 2 | 1,52 X |
| | SPRR1B | 2,6 X |
| | TIMP 2 | - 1,7 X |
| LDL 24 H | TBXA2R | 1,84 X |

Nous pouvons constater que l'induction de l'ensemble des gènes est généralement assez faible. Les résultats vont être discutés au point suivant.

3.3.4 Discussion des résultats d'hybridation :

À présent, nous allons discuter les résultats des différentes hybridations réalisées au cours de ce mémoire. Nous discuterons d'abord les effets du LPS sur l'expression génique des monocytes puis l'effet du PMA et, enfin, l'effet des LDL natives.

1. Effets du LPS sur l'expression génique des THP-1 :

Comme il a été décrit dans les résultats, plusieurs gènes sont induits dans la condition LPS. Le LPS est bien décrit dans la littérature pour déclencher une réponse inflammatoire chez le monocyte. Les différentes voies de transduction du signal activées sont décrites au point IV.2 de l'introduction (Guha *et al.*, 2001). Ces gènes sont regroupés en différentes classes.

Les gènes principalement induits sont des gènes encodant des cytokines. Nous y retrouvons l'IL1- β , l'IL-8, l'IL-15 et le TNF- α . Ces résultats ne sont pas surprenants puisque le LPS déclenche l'activation du monocyte et génère une réponse inflammatoire chez celui-ci. Suzuki et son équipe (2000) ont également observé une induction de l'IL-8, de l'IL1- β et du TNF- α après stimulation pendant 3H avec du LPS à 1 μ g/ml sur des leucocytes fraîchement isolés à partir de sang humain. L'IL-8, induite 723 fois sur le CD généraliste, est synthétisée par différents types cellulaires : les lymphocytes et évidemment les monocytes/macrophages. Il s'agit d'une CXC chémokine connue pour jouer un rôle chémoattractant pour les lymphocytes. Ceux-ci s'accumulent aussi sous l'intima et interviennent dans le développement de la plaque athéromateuse. L'IL-8 joue également le rôle de facteur angiogène et son induction va donc amplifier la formation de la lésion athérosclérotique et jouer un rôle dans la fragilité de la plaque. Suzuki et son

équipe (2000) observent aussi une induction de l'IL-6 et de la COX2 (Cycloxygénase 2) que nous n'observons pas, pourtant ces deux gènes sont présents sur la GeneralChip. La différence provient peut-être du type cellulaire utilisé, qui n'est pas le même. Les cytokines sont donc très fortement induites en présence de LPS.

En plus des cytokines, différentes enzymes sont exprimées par le monocyte en présence de LPS. Nous observons une induction de la MMP9 (Metalloprotéinase 9) de 6 fois (CD généraliste). Cette enzyme fait partie de la famille des métalloprotéinases et intervient dans la dégradation et le remodelage local de la matrice extracellulaire pour faciliter le passage du monocyte entre les cellules endothéliales lors d'une diapédèse. En présence de LPS, le monocyte est activé puis attiré par les cellules endothéliales pour enfin traverser l'endothélium et se retrouver dans les tissus sous-jacents où il se différenciera en macrophage. Il est décrit dans la littérature que la synthèse de MMP9, par les monocytes, est stimulée par des chémokines comme le MCP-1 (Robinson *et al.*, 2002). MCP-1 est, en fait, sécrété par les cellules endothéliales lorsque celles-ci sont activées et joue un rôle chémoattractant pour le monocyte. On peut, donc constater une interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales. Il est donc logique d'observer une induction de ce type d'enzymes en condition LPS : le monocyte répond à la présence d'un pathogène et entame la diapédèse. Cette augmentation de l'expression de MMP9 a aussi été observée dans une étude réalisée par Suzuki et son équipe (2000).

Nous retrouvons également une induction de la MnSOD2 (Superoxyde dismutase) de 67 fois (CD généraliste) et de 57 fois (GeneralChip). Cette enzyme joue un rôle de protection contre les radicaux libres comme, par exemple, $O_2^{\bullet-}$ (Xu *et al.*, 2000). Au cours d'une réponse inflammatoire du monocyte/macrophage à un pathogène, des radicaux libres sont produits. Le monocyte répond sans doute à cette production de radicaux libres par la synthèse de la SOD2 qui permettra « d'éliminer » ceux-ci.

Une troisième classe regroupe les molécules intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. Les IGFBP (Insulin Like Growth Factor Binding protein) sont des petites hormones ou facteurs de croissance qui peuvent stimuler la prolifération cellulaire et la différenciation de différents types cellulaires. Nous observons une forte augmentation de l'expression de deux IGFBP : IGFBP3 et IGFBP5 qui sont induits de, respectivement, 97 fois (CD généraliste) et 133 fois (GeneralChip). Les résultats pour les deux IGFBP sont surprenants car selon le support, l'induction est totalement différente. Ils devront être confirmés par PCR en temps réel. Suite à la détection de la présence d'un pathogène par le monocyte, celui-ci synthétiserait ces facteurs de croissance pour stimuler sa prolifération cellulaire pour mieux faire face aux pathogènes présents dans les tissus.

Dans cette classe nous pouvons aussi parler de MDM2 qui est un facteur favorisant la prolifération cellulaire. MDM2 interagit avec p53 qui est une protéine bloquant le cycle cellulaire en phase G1 (Tweddle *et al.*, 2003). En présence de MDM2, le cycle cellulaire ne sera plus bloqué et la cellule pourra se diviser. Sur le CD Généraliste, MDM2 est induit 86 fois et fait partie des gènes les plus fortement induits.

Nous trouvons, dans une quatrième classe, les molécules d'adhérence. ICAM-1 est induit 31 fois (CD Généraliste) et 12 fois (GeneralChip). ICAM-1 est effectivement néo-

synthétisé par les monocytes mais aussi par les cellules endothéliales au cours de la diapédèse. Le rôle d'ICAM-1 au niveau des monocytes est moins bien connu. Mais, Anefieria et Krasnikova (2001) ont montré que ICAM-1 favoriserait l'adhérence des monocytes sur le fibrinogène natif ou partiellement dégradé, ce qui favorise un contexte pro-coagulant.

Enfin, nous trouvons une classe de molécules pro-inflammatoires, les protéines S100. Nous observons une augmentation de l'expression de S100A8 de 5 fois sur le CD généraliste. Les protéines S100 lient le calcium et constituent un nouveau groupe de molécules pro-inflammatoires synthétisées par les phagocytes dont les macrophages (Roth *et al.*, 2003). L'ensemble des fonctions de ces protéines n'est pas encore totalement connu. S100A8 forme un complexe avec S100A9 et ces deux protéines sont exprimées par le monocyte/macrophage suite à un stimulus comme des chémokines ou la présence de bactéries. L'interaction de ce complexe avec les phagocytes va augmenter l'activité de liaison des intégrines qui sont des molécules d'adhérence intervenant dans la diapédèse du monocyte.

L'ensemble des gènes induits sur la GeneralChip et le CD Généraliste en condition LPS rentre donc bien dans un contexte inflammatoire de réponse à une agression d'un pathogène. Ils sont également en accord avec plusieurs données de la littérature.

2. Effets du PMA sur l'expression génique des THP-1 :

Nous retrouvons plusieurs gènes identiques à la condition LPS. À nouveau, nous pouvons les diviser en plusieurs classes.

Parmi les cytokines, l'IL1- β voit son expression augmentée de plus de 100 fois. Les macrophages sont, effectivement, des cellules reconnues pour pouvoir synthétiser des quantités importantes d'IL1- β . Par contre, à l'inverse de la condition LPS, c'est la seule cytokine qui est induite. Nous ne sommes plus dans un contexte inflammatoire. Effectivement, le PMA est utilisé *in vitro* pour différencier les monocytes en macrophages.

Nous retrouvons aussi la MMP9 qui est exprimée 3 fois plus. Comme décrit ci-dessus, cette enzyme intervient dans la dégradation de la matrice extracellulaire lors de la diapédèse du monocyte. Le monocyte est une cellule circulante alors que le macrophage est tissulaire. Pour passer du sang aux tissus, suite à une activation, le monocyte doit donc traverser la barrière endothéliale et les métalloprotéinases sont donc nécessaires. Mais le macrophage est également une cellule éboueur libérant des protéases dans le milieu extracellulaire.

IGFBP3 et IGFBP 5 sont aussi induits dans la condition PMA. Dans le damier "four" IBFBP3 est induit 3 fois et IGFBP5 de 2,8 fois. Dans le damier « thermomixeur », IGFBP3 est surexprimé 4 fois et IGFBP5 est surexprimé 21 fois. Ces deux protéines ont déjà été brièvement décrites ci-dessus, au point 1.

La molécule d'adhérence ICAM-1 voit son expression génique augmentée de 1,86 fois dans le damier "four" et de 5 fois sur le damier "thermomixeur". Elle contribue aux propriétés adhésives du macrophage (DesJardin *et al.*, 2002).

Nous retrouvons, également, une induction de 19 fois (damier four) et 47 fois (damier thermomixeur) pour l'OPN (Ostéopontine). Cette protéine est un composant de la matrice extracellulaire et est synthétisée par les macrophages dans les lésions athérosclérotiques. Elle intervient dans la calcification et est donc souvent co-localisée dans les plaques athéromateuses. De plus, l'ostéopontine favorise l'adhérence et la migration cellulaire (Jono *et al.*, 2000). Les résultats concordent avec ceux de Oyama et son équipe (2001) qui observent également une induction de l'OPN suite à une stimulation de 24 H des THP-1 avec le PMA.

Plusieurs gènes encodant des facteurs de transcription sont également induits. Nous observons une induction d'EGR-1 (Early Growth response 1) de 5 fois dans le damier « four » et de 8 fois dans le damier « themomixeur ». EGR-1 est un facteur de transcription induit durant la différenciation des cellules myéloïdes et qui est essentiel à la différenciation du monocyte en macrophage. Akuzawa et son équipe (2000) observent une induction de flt-1 (*fms*-like tyrosine kinase-1 receptor) qui est un gène cible du facteur de transcription EGR-1 quand les THP-1 sont en présence de PMA.

A l'inverse d'une stimulation des THP-1 avec le LPS, nous ne sommes pas dans un contexte inflammatoire, même si nous retrouvons l'induction de certains gènes qui est identique dans les deux cas. Les gènes ICAM-1 et MMP9, par exemple, sont induits dans les deux conditions et interviennent dans le phénomène de diapédèse. Ces résultats ne sont pas étonnants, car, que ce soit dans une réponse inflammatoire du monocyte ou dans sa différenciation en macrophage, il devra, dans les deux cas, effectuer la diapédèse. De plus une stimulation au PMA aboutit à une différenciation, alors que pour le LPS, les monocytes répondent à un pathogène et cette réponse inclut la diapédèse du monocyte mais aussi l'induction de tous les gènes permettant de neutraliser le pathogène. Pour le LPS et le PMA, nous retrouvons bien les profils d'expression génique attendus, ce qui valide la technique utilisée sur notre modèle.

3. Effets des LDL sur l'expression génique des THP-1 :

C'est pour les LDL que les résultats sont les plus originaux, puisqu'il n'y a que peu de données dans la littérature sur les effets des LDL sur l'expression génique des monocytes. Signalons que Han et son équipe (1998) ont montré que les LDL, après 24 H d'incubation, entraînent une légère augmentation de l'expression de CCR2B, le récepteur au MCP-1. La même équipe (Han *et al.*, 2003) vient de montrer tout récemment que les LDL induisent également la surexpression de 2,5 fois de l'intégrine CD11b après 24H. Malheureusement, la GeneralChip ne permet pas de mesurer l'expression ni de CCR2B, ni de cette intégrine. Nous avons donc décidé de stimuler les monocytes avec les LDL pendant des temps croissants. Dans les stimulations avec les LDL, une cinétique de temps a donc été réalisée : 4 H, 6 H, 12 H et 24 H. En analysant les résultats de cette cinétique, nous observons que le temps 12 H semble le plus intéressant pour une stimulation des

THP-1 avec les LDL. En général, nous retrouvons peu de gènes induits et les variations d'expression génique observées sont généralement assez faibles. Toutefois, nous y retrouvons certains gènes qui ont un rapport direct avec le développement de la plaque athéromateuse.

La condition LDL 4 H :

Nous retrouvons, comme enzyme, la MMP 14 (metalloprotéinase 14) qui est induite 1,72 fois et qui pourrait intervenir lors du passage du monocyte à travers la barrière endothéliale. Cette enzyme dégrade la matrice extracellulaire et faciliterait la migration du monocyte entre les cellules endothéliales.

Nous trouvons aussi un facteur de transcription, le TFAP2A qui voit son expression augmentée de 1,67 fois. Ce facteur de transcription fait partie de la famille AP-2, proche de AP-1. Sofia Dos Santos a déjà étudié l'activation d'AP-1 par un test colorimétrique quand les monocytes sont en présence ou non de LDL, et AP-1 était induit de 1,4 fois. L'augmentation de l'expression de TFAP2A sur damier à ADN est donc conforme avec les résultats obtenus par test colorimétrique sur l'activation du facteur AP-1. Ces facteurs sont différents mais ils font partie de mêmes familles et pourraient donc être, tous les deux, activés chez le monocyte quand celui-ci est en présence de LDL.

uPAR (Urokinase-receptor) est un gène également induit (1,81 fois). Il s'agit d'une molécule multifonctionnelle qui intervient, entre autres, dans l'adhérence et la migration des leucocytes. L'expression de ce gène est, de plus, augmentée en présence de chémokines comme MCP-1 (Nakayama *et al.*, 2002).

Enfin, nous retrouvons TB 10 (Thymosin- β 10). Cette molécule intervient dans l'organisation du cytosquelette et peut interagir avec la β -actine. Au cours d'une diapédèse, le monocyte doit complètement se déformer et donc réarranger l'ensemble de son cytosquelette. TB10 peut donc jouer un rôle dans ce réarrangement de la structure du monocyte.

La condition LDL 6 H :

Comme il a été expliqué plus haut, les résultats obtenus dans cette condition ne sont pas fiables à 100 %. Nous discuterons, cependant, l'induction du gène KNSL5 (Mitotic Kinesin like protein 1). Cette protéine est induite 2,26 fois et joue un rôle pro-prolifératif. Elle intervient, plus particulièrement, comme « moteur » des microtubules. Elle interviendrait aussi dans le remodelage du monocyte au cours de son passage entre les cellules endothéliales pendant le phénomène de diapédèse.

La condition LDL 12 H :

À nouveau, nous retrouvons la présence d'une metalloprotéinase : la MMP2. Nous pouvons donc remarquer que ces enzymes se retrouvent souvent dans des circonstances

de diapédèse, que ce soit lors d'une inflammation, dans le cas d'une différenciation du monocyte en macrophage ou dans un contexte athérosclérotique.

En accord avec ce qui vient d'être discuté, nous observons une répression de deux inhibiteurs de MMP2 : TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2) qui est réprimé de 1,7 fois et TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1) qui est réprimé de 1,72 fois. Tous ces résultats concordent donc entre eux et vont dans le sens d'une capacité augmentée des monocytes à traverser l'endothélium.

Enfin, nous observons une augmentation de 2,6 fois de l'expression de SPRR1B (Cornifine). Ce résultat est plutôt surprenant car la cornifine est plutôt typique des tissus épithéliaux.

La condition LDL 24 H :

Dans cette condition, nous ne trouvons qu'un seul gène qui est induit : le TBXA2 (récepteur au thromboxane A2). Ce récepteur est reconnu par le thromboxane A2, mais aussi par les 8- isoprostanes, molécules dérivées de l'acide arachidonique par peroxydation et marqueurs de stress oxydatifs. Or, les 8- isoprostanes sont des molécules également bioactives, exerçant des effets sur les plaquettes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, plutôt avec des effets pro-athérogènes. Les 8- isoprostanes ont également été détectés au niveau des lésions athéromateuses. Il est prématuré d'interpréter l'induction de TBXA2, mais elle pourrait aussi s'inscrire dans un contexte pro-athérogène.

Très peu d'études sont réalisées sur l'effet des LDL natives sur les monocytes. Nous ne pouvons donc pas facilement comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Han et son équipe (1998) ont travaillé sur l'effet des LDL natives au niveau de l'expression génique du récepteur CCR2 et sont arrivés à la conclusion que les LDL natives augmentent l'expression de ce récepteur chez les THP-1. Malheureusement, CCR2 ne se trouvant pas sur la GeneralChip, nous n'avons pas pu observer cette induction. Par contre, il est important de signaler que les LDL oxydées répriment ce récepteur (Han et Quehenberger., 2000), et donc que les LDL natives jouent certainement un rôle tout à fait spécifique.

L'ensemble des gènes induits au cours de cette cinétique de temps suggère bien que le monocyte ne se trouve pas dans un contexte inflammatoire, à proprement parler, quand celui-ci est stimulé avec les LDL : aucune cytokine n'est surexprimée, par exemple. Mais les gènes induits en condition LDL sont plutôt en relation directe avec la diapédèse : des métalloprotéinases qui dégradent localement la matrice extracellulaire, des protéines intervenant dans la structure du monocyte comme SPRR1B et TB10, ou encore des protéines favorisant l'adhérence et la migration des leucocytes (uPAR).

Nous pouvons dire que les LDL semblent prédisposer les monocytes à traverser la barrière endothéliale. Il est cependant important de signaler que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et qu'il sera nécessaire de la recommencer pour « confirmer » nos premiers résultats.

III. Confirmation des résultats obtenus sur damiers avec la PCR en temps réel :

1. Résultats :

La PCR en temps réel est une autre approche moléculaire utilisée au cours de ce mémoire pour mesurer l'expression de certains gènes d'intérêt au niveau des ARNm. Le but était de confirmer les variations d'expression génique des gènes différemment exprimés entre les conditions contrôle et test sur la GeneralChip et le Général CD, mais aussi pour les 3 gènes décrits par Sébastien Toffoli au cours de son mémoire : l'IL-1 β , le TNF α et la THBD (Toffoli, 2002).

Le principe et la méthode sont expliqués dans le chapitre Matériels et Méthodes au point III.6. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'IL-1 β , le TNF α et la THBD pour confirmer les résultats obtenus par Sébastien Toffoli au cours de son mémoire l'an passé. Par la suite, après analyse des résultats de la GeneralChip et du CD Généraliste, nous avons décidé de confirmer les résultats pour la SOD2, ICAM-1 et l'IL8 pour les conditions CTL-LPS. Ces 3 gènes ont été choisis à cause de leur fonction. En outre, des amorces étaient disponibles au laboratoire. Enfin, nous prendrons le gène GAPDH comme gène de référence.

Au laboratoire, nous testons les efficacités de PCR en parallèle avec la GAPDH en utilisant d'abord les concentrations en amorces 300 nM/300 nM pour chaque gène d'intérêt (Méthode décrite au point 5 des Matériels et Méthodes). Nous savons que ces concentrations fonctionnent généralement bien. Mais pour la plupart des gènes étudiés, les concentrations 300 nM/300 nM ne sont pas avérées optimales dans notre cas. Nous avons donc réalisé une matrice d'amorces pour tous les gènes d'intérêt sauf pour SOD2. Nous avons donc mis au point les concentrations d'amorces pour ces différents gènes. Une analyse des Ct est réalisée pour chaque gène. Ceux-ci doivent être les plus petits possible et les blancs doivent posséder un Ct d'au moins 40. À partir des Ct obtenus, nous décidons quelle concentration sera optimale pour chaque gène. L'exemple pour ICAM-1 est donné à la figure 3.19.

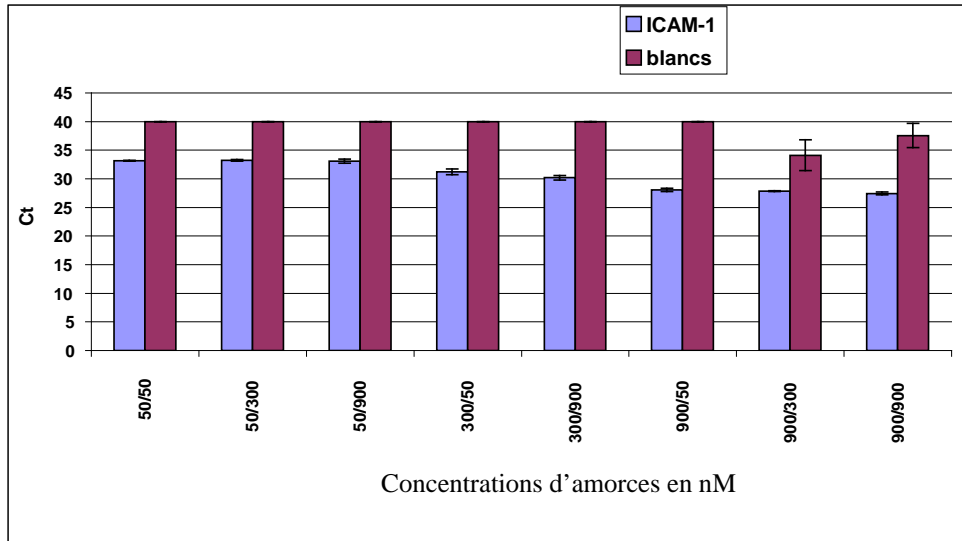


Figure 3.19 : Matrice d'amorces pour ICAM-1 : Ce graphe reprend les Ct en fonction des différentes concentrations d'amorces exprimées nM (sens / antisens). Nous utilisons le même ADN pour toutes les conditions et des blancs sont réalisés pour chaque concentration testée.

La figure 3.19 reprend les Ct en fonction des différentes concentrations d'amorces testées (nM). Dans l'exemple d'ICAM-1, nous avons choisi les concentrations 900 nM pour l'amorce sens et 50 nM pour l'amorce antisens. Ces concentrations ont été choisies car c'est pour elles que le Ct est le plus bas et les blancs ne sont pas amplifiés ($Ct \geq 40$). Des concentrations plus élevées en amorce antisens engendrent des blancs « contaminés » (pour les concentrations 900/300 et 900/900 nM). Cela signifie que les amorces forment des dimères entre elles car elles sont en excès par rapport à l'ADN. Cela engendre donc des amplifications aspécifiques.

Les résultats de ces mises au point préliminaires, pour l'ensemble des gènes qui seront confirmés par PCR en temps réel, sont repris dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Tableau reprenant les différents concentrations en amorces utilisées pour chaque gène étudié.

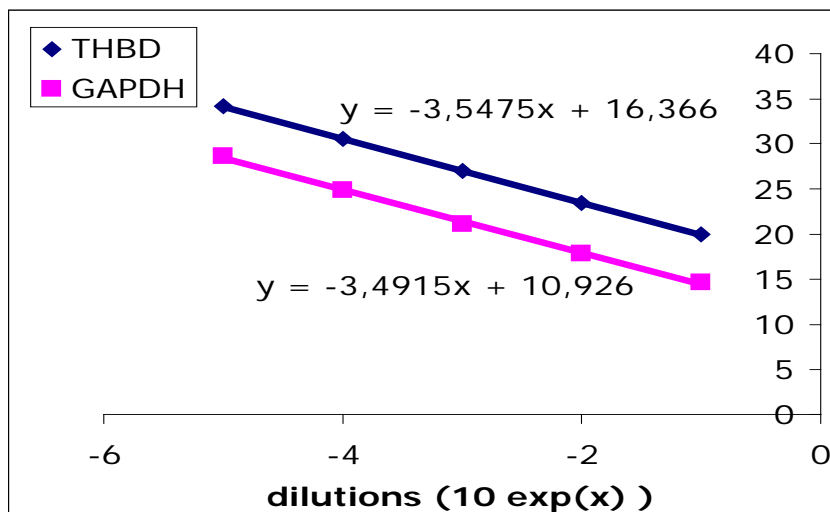
| Gènes d'intérêt | Amorce Sens | Amorce Antisens |
|-------------------------------|-------------|-----------------|
| IL1-β | 50 nM | 50 nM |
| TNFα | 900 nM | 300 nM |
| THBD | 50 nM | 50 nM |
| SOD2 | 300 nM | 300 nM |
| ICAM-1 | 900 nM | 50 nM |
| GAPDH | 300 nM | 300 nM |

Le gène de maintenance utilisé est la GAPDH. Les concentrations optimales ont été mises au point par Sofia Dos Santos et sont de 300 nM pour l'amorce Sens et 300 nM pour l'amorce Antisens.

En ce qui concerne l'IL-8, lorsque nous avons testé les concentrations 300 nM/300 nM, nous avons constaté qu'il y avait des amplifications aspécifiques importantes (fig. 3.20). Le pic principal de la courbe de dissociation se situe à une température de 78°C. Cette température correspond effectivement à la température de Melting (T_M) de l'amplicon donnée par le programme « Primer Express » et est la température à laquelle les brins d'ADN se dissocient (voir tableau 2.11 des Matériels et Méthodes). Par contre, nous pouvons constater la présence de 2 pics supplémentaires correspondant à des amplifications aspécifiques. Ces amplifications ne doivent normalement pas exister, seul le pic principal correspondant à la T_M de l'amplicon doit être présent. Nous avons laissé ce gène de côté et n'avons pas réalisé de matrice d'amorces, celles-ci devant être redéfinies.

Dans un deuxième temps, nous comparons les efficacités de PCR pour chaque gène avec le gène de maintenance, GAPDH (fig. 3.21 a). Nous réalisons des courbes standard pour le gène d'intérêt et pour la GAPDH sur une de nos préparations d'ADNc. À partir des Ct, nous réalisons un graphe qui reprend les Ct du gène d'intérêt et de la GAPDH en fonction des différentes dilutions. Pour que 2 gènes soient comparables, les 2 droites obtenues doivent posséder une pente plus ou moins identique. L'exemple de la THBD est repris dans la figure 3.21a : pour la THBD, la pente est de $-3,5475$, et pour la GAPDH, la pente est de $-3,4915$. En rapportant les valeurs des delta Ct (Ct du gène d'intérêt $-$ Ct de la GAPDH) en fonction des dilutions, nous obtenons une nouvelle droite dont la pente est de $-0,056$, ce qui reste $\leq 0,1$ (Fig. 3.21 b). Dans ce cas-ci, les 2 droites sont donc bien parallèles, ce qui signifie que les efficacités de PCR pour ces 2 gènes sont comparables. L'efficacité de PCR se calcule comme suit : $E (\%) = (10^{-(1/a)} - 1) \times 100$. Dans cette formule, E représente l'efficacité de PCR, et a la pente de la droite. Pour GAPDH et THBD, les efficacités de PCR sont respectivement de 93% et 91%, et sont donc fort proches.

a.



b.

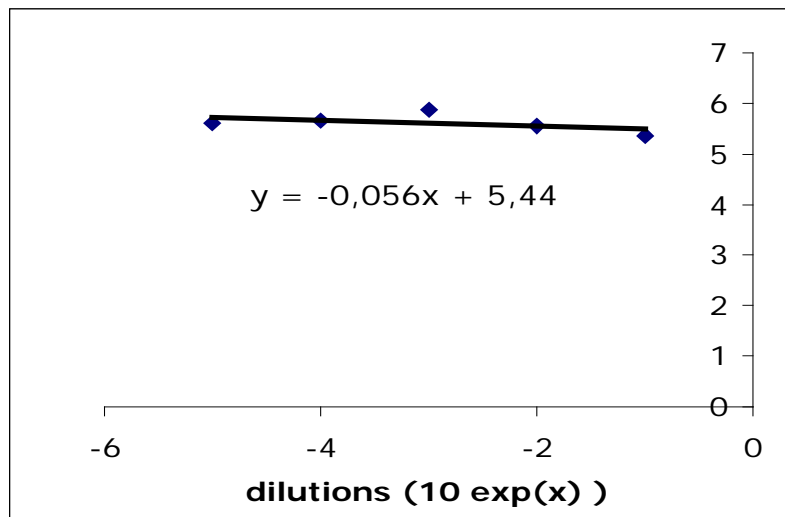


Figure 3.21 : Comparaison des efficacités de PCR pour la THBD et la GAPDH : Nous avons effectué une PCR en temps réel pour la THBD aux concentrations 50 nM/50 nM et pour la GAPDH aux concentrations 300 nM/300 nM. (a) Graphe des différents Ct en fonction des dilutions. (b) Graphe des delta Ct en fonction des dilutions.

Pour tous les gènes, sauf pour ICAM-1, les efficacités de PCR sont comparables avec le gène de maintenance, la GAPDH. La méthode de calcul des delta delta Ct peut donc être utilisée. Pour ICAM-1, la méthode des courbes standard sera nécessaire. Ces deux méthodes sont décrites plus loin.

Pour terminer, nous effectuons une PCR en temps réel sur les gènes d'intérêt, avec les concentrations choisies auparavant, dans les conditions contrôle et test (dans notre cas, le LPS). Nous pourrions, alors, constater si ce gène est induit ou non dans la condition test par rapport à la condition contrôle. Si un gène est plus fortement exprimé dans la condition test, son Ct sera plus petit. La figure 3.22 nous montre l'exemple pour l'IL1-   et le gène de maintenance GAPDH. Nous remarquons bien une différence entre la condition contrôle et la condition LPS. L'IL1-à possède un Ct plus petit en condition LPS qu'en condition contrôle, ce qui signifie que la quantité d'ADN est plus importante : ce gène est donc bien induit quand les monocytes sont stimulés avec le LPS pendant 6 H. Par contre, nous n'observons aucune différence entre la condition contrôle et LPS pour la GAPDH, ce qui est tout à fait rassurant puisqu'un gène de maintenance valable doit présenter une expression qui reste constante dans toutes les conditions.

Pour calculer le pourcentage d'induction d'un gène, nous effectuons ces différents calculs :

- Nous calculons, en premier lieu, la moyenne des Ct des gènes pour chaque condition étudiée : CTL et LPS.
- Nous calculons le delta Ct pour chaque condition testée (CTL et LPS) = Moyenne des Ct du gène d'intérêt - Moyenne des Ct de la GAPDH.

- Puis le delta delta Ct est calculé = delta Ct de la condition LPS – delta ct de la condition CTL.
- Pour terminer, nous calculons l'expression du gène qui s'exprime comme suit :
Expression = $2^{\text{exp}(-\text{delta delta Ct})}$

Pour ICAM-1 (figures non montrées), les efficacités de PCR ne sont pas comparables avec la GAPDH, bien que les mises au point des concentrations d'amorces aient été réalisées (voir tableau 3.3). Nous ne pouvons donc pas utiliser la méthode des delta delta Ct pour calculer le pourcentage d'induction de ce gène en condition LPS. Nous avons donc une méthode alternative : la méthode des courbes standard qui nécessite de réaliser des courbes standard pour chaque gène. Les différentes étapes à suivre sont les suivantes :

- Nous calculons la moyenne des quantités d'ADN (calculée par le programme « SDS Software » en fonction des courbes standard) pour chaque gène et dans chaque condition : CTL et LPS
- Puis, pour chaque gène, nous normalisons les résultats par les contrôles, c'est-à-dire que nous faisons le rapport entre la moyenne des quantités d'ADN d'un gène en condition LPS sur la moyenne des quantités d'ADN du même gène en condition contrôle.
- Pour terminer, nous normalisons par rapport au gène de maintenance en réalisant le rapport entre le gène d'intérêt et le gène de maintenance (GAPDH). Cela nous donne l'induction du gène d'intérêt en condition LPS.

Les résultats obtenus pour les différents gènes sélectionnés, sont représentés dans le tableau 3.4 et comparés avec les résultats obtenus sur les damiers à ADN. Chaque PCR en temps réel a été réalisée 2 fois.

Tableau 3.4 : Tableau comparatif des résultats obtenus par hybridation sur micro-damiers à ADN et par Real-Time PCR sur l'induction de cinq gènes après stimulation de cellules THP-1 avec le LPS. (nd : non déterminé).

| | damier prototype | CD généraliste | GeneralChip | PCR en temps réel | |
|---------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------------|-------|
| IL1-β | 56 X | 70 X | 79 X | 95 X | 140 X |
| TNFα | 12 X | 4 X | nd | 6 X | 13 X |
| THBD | 6 X | nd | nd | 2,5 X | 3 X |
| SOD2 | nd | 57 X | 67 X | 23 X | 27 X |
| ICAM-1 | nd | 31 X | 31 X | 26 X | 50 X |

L'ensemble des gènes testés par PCR en temps réel confirme donc globalement les résultats obtenus sur les damiers à ADN. Les inductions sont du même ordre de grandeur et les différences s'expliquent en partie parce que les deux techniques reposent sur des principes de quantification très différents.

Néanmoins, la PCR en temps réel est actuellement la technique la plus fiable et la plus souvent utilisée pour confirmer des inductions de gènes obtenus sur damiers.

2. Discussion :

Plusieurs auteurs utilisent cette technique pour confirmer leurs résultats. Oida et son équipe (1997) utilisent la PCR en temps réel lors de leur étude sur l'expression de la THBD en stimulant les THP-1 avec les LDL oxydées. Han et son équipe (2000) confirment également leurs résultats par PCR en temps réel dans leur étude sur la variation d'expression du gène encodant CCR2B pour des cellules THP-1 contrôles et stimulées avec les LDL oxydées. Cette technique est donc fiable et se retrouve souvent dans la littérature pour des études au niveau de l'expression génique.

IV. La transfection :

1. Introduction :

La transfection constitue une approche moléculaire intéressante pour étudier les différentes voies de transduction du signal qui seraient impliquées lors d'une stimulation des THP-1 avec les LDL, et ce via des constructions avec un gène rapporteur. Au cours de ce travail, nous avons bénéficié d'un appareil de nucléofection, le système Nucleofector de la firme Amaxa (Allemagne). Il s'agit d'un électroporateur permettant l'introduction d'ADN exogène, directement dans le noyau. Nous avons donc effectué une série de mises au point des différents programmes d'électroporation, mais aussi celles concernant la densité cellulaire et la concentration en plasmide à transférer dans les cellules THP-1. Le but, à moyen terme, est de transférer les cellules THP-1 avec des plasmides comportant un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur. Les promoteurs choisis sont soit des promoteurs artificiels comportant des séquences consensus pour des facteurs de transcription, soit des promoteurs authentiques de gènes d'intérêt sélectionnés. Dans ce dernier cas, il faut isoler les clones du promoteur. En testant les antagonistes des différents acteurs des voies de transduction du signal (ERK, JNK, ...), il sera possible de déterminer celles qui sont impliquées dans l'induction de certains gènes quand les monocytes sont stimulés avec les LDL. La technique de nucléofection a été décrite dans le point IV.7 du chapitre Matériels et Méthodes.

2. Résultats :

La première étape était de déterminer le programme de transfection le plus adapté aux THP-1. Une série de 9 programmes, conseillés par la firme Amaxa, ont été testés sur les cellules THP-1. Celles-ci sont transfectées avec 2,5 µg de plasmide pCMVβ codant pour la β-galactosidase ou 2,5 µg de plasmide E-GFP-N1. L'activité β-galactosidase est mesurée 24 H après la transfection.

Les résultats des mesures de l'activité β-galactosidase sont représentés dans la figure 3.23 :

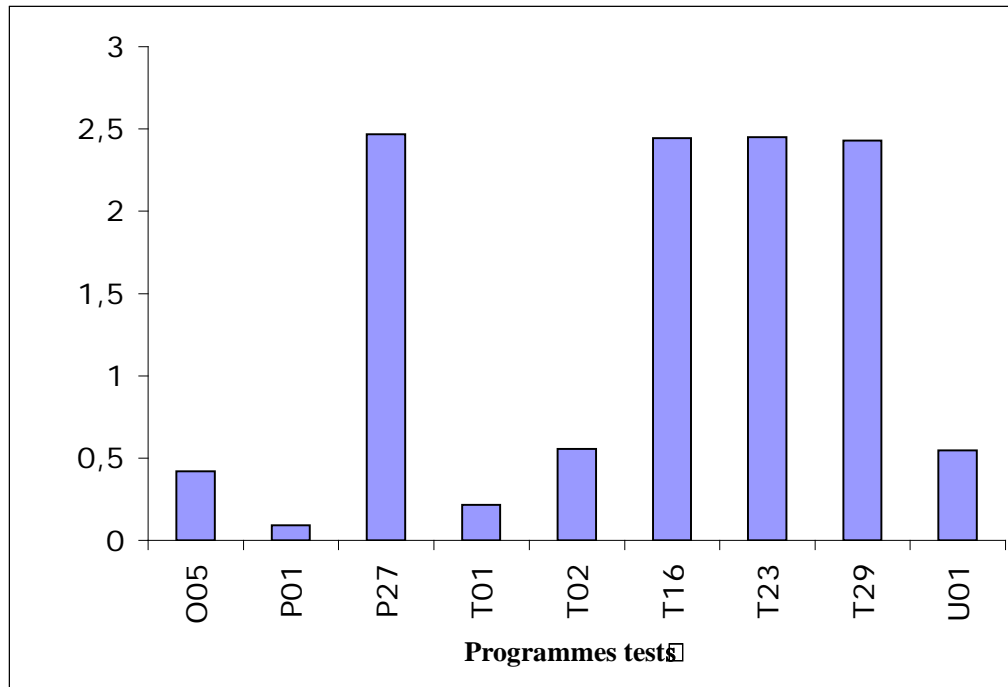


Figure 3.23 : Comparaison des différents programmes de transfection par électroporation sur l'efficacité de transfection des cellules THP-1: Nous avons transfecté les THP-1 avec 2,5 µg de plasmide pCMVβ qui code pour la β-galactosidase. Après 24 h, nous ajoutons le substrat de l'enzyme, l'ONPG, et mesurons l'activité β-galactosidase par dosage colorimétrique après 1 h.

Nous observons que l'activité β-galactosidase est la plus importante pour quatre programmes : P-27, T-16, T-23 et T-29. Parmi ces programmes retenus, nous avons décidé de travailler avec le programme T-29. Celui-ci donne la meilleure activité β-galactosidase déjà après 30 min d'incubation avec le substrat ; à des temps plus longs, les signaux saturent. De plus, Sofia Dos Santos avait déjà testé ces programmes, mais, sur des clones cellulaires différents. Le T-29 était le programme retenu, car il donnait la meilleure activité β-galactosidase et la meilleure efficacité de transfection.

Après cette première mise au point, nous avons estimé le taux de mortalité des cellules ainsi que le taux de transfection après 24 h et 48 h, pour ce programme. Pour cela, nous transfectons 1.10^6 cellules avec 2,5 µg de plasmide E-GFP-N1 et estimons le taux de mortalité et de transfection après 24 h et 48 h. Le taux de mortalité est estimé par l'incorporation de Bromure d'éthidium - Acridine orange et le taux de transfection par comptage cellulaire des cellules fluorescentes, comme décrit au point 6 du chapitre Matériels et Méthodes. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.5 :

Tableau 3.5 : Tableau reprenant les taux de mortalité et de transfection avec le programme T-29, 24 H et 48 H après la transfection des monocytes avec 2,5 µg d'E-GFP-N1.

| | Taux de mortalité : | Taux de transfection : |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| <u>24 H après la transfection :</u> | 40 % | 15 à 20 % |
| <u>48 H après la transfection :</u> | 80 % | Taux de transfection très faible |

24 H après la transfection, le taux de mortalité est de 40 %, ce qui reste acceptable. De plus, le taux de transfection est relativement élevé, allant de 15 à 20 %. Par contre, 48 H après la transfection, les cellules ont une morphologie fort différente, elles sont devenues très petites et forment des amas gélatineux. Le taux de transfection a chuté et est très faible. Le taux de mortalité est très important, plus de 80 % de cellules sont mortes.

Nous avons décidé d'abandonner ce programme qui était trop puissant au niveau de l'électroporation et de choisir un autre programme assurant une efficacité de transfection moindre que celle du T-29 mais qui serait moins « stressant » pour les THP-1. Nous avons alors testé les programmes T-02, U-01 et O-05. Nous transfectons, à nouveau, 1.10^6 cellules avec 2,5 µg d'E-GFP-N1 et testons le taux de transfection et le taux de mortalité après 24 H et 48 H. Les résultats sont repris dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Tableau reprenant les taux de mortalité et de transfection avec les programmes T-02, U-01 et O-05 24 H et 48 H après la transfection des monocytes avec 2,5 µg d'E-GFP-N1.

| | Programmes de transfection : | Taux de mortalité : | Taux de transfection : |
|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 24 H après la transfection : | T-02 | 20 % | 8 % |
| | U-01 | 20 % | 10 % |
| | O-05 | 50 % | 3,5 % |
| 48 H après la transfection : | T-02 | 50 % | 4 % |
| | U-01 | 50 % | 10 % |
| | O-05 | 60 % | 5 % |

À partir de ces résultats, nous avons choisis le programme U-01. Celui-ci assure le taux de transfection le plus élevé des trois programmes testés 24H après la transfection : 10% de la totalité des cellules (1.10^6 cellules) sont transfectées et il provoque également un taux de mortalité assez faible : seulement 20 % des cellules sont mortes. 48 H après la transfection, les programmes T-02 et O-05 ne sont pas efficaces. Ce n'est pas le cas d'U-01, pour lequel on observe toujours 10 % de cellules transfectées avec 50 % de mortalité.

La seconde partie de cette mise au point a consisté à tester différentes concentrations de plasmide et différentes densités cellulaires sur le programme choisi : U-01.

Nous testons trois concentrations de plasmides E-GFP-N1 et pCMVβ : 1 µg ; 2,5 µg et 5 µg et deux densités cellulaires : $0,5.10^6$ et 1.10^6 cellules.

Nous transfectons les cellules THP-1 avec les différentes concentrations de plasmide pCMV β . 24 H après la transfection, nous ajoutons le substrat de la β -galactosidase (l'ONPG) et mesurons son activité par dosage colorimétrique. Les résultats sont représentés dans la figure 3.24.

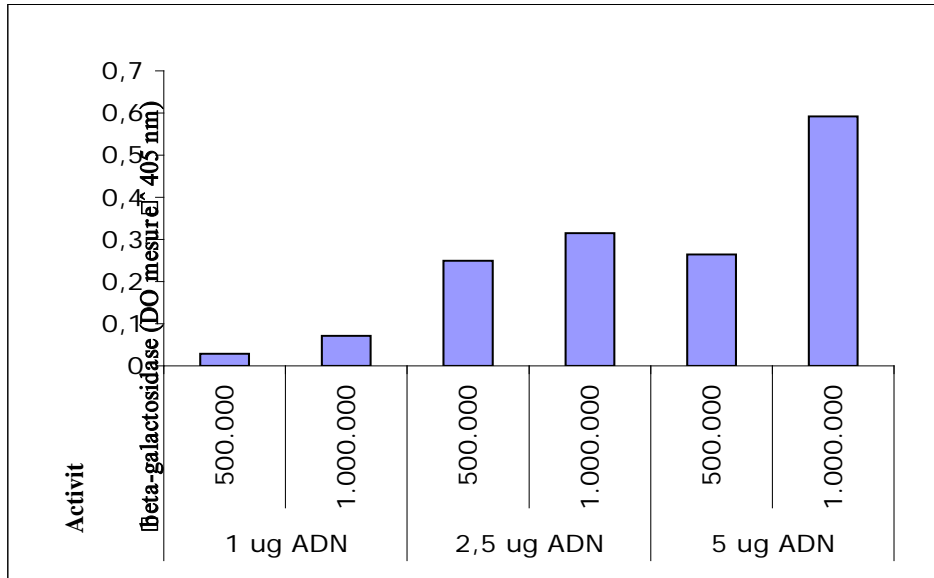


Figure 3.24: Optimisation du programme de transfection U-01: Nous avons testé trois concentrations en plasmides pCMV β (1 μ g, 2,5 μ g et 5 μ g) et deux densités cellulaires (0,5.10⁶ et 1.10⁶ cellules). 24 H après la transfections, nous ajoutons l'ONPG et nous mesurons l'activité de la β -galactosidase par dosage colorimétrique (DO à 405 nm) après 1 H.

Nous pouvons observer que c'est pour la concentration de 5 μ g d'ADN à la densité de 1.10⁶ cellules que l'activité β -galactosidase est la plus élevée. De plus, la morphologie cellulaire était normale : les cellules continuaient de former des grappes (voir point I du chapitre Matériels et Méthodes).

De plus, nous transfectons également les cellules THP-1 avec le plasmide E-GFP-N1 pour estimer le taux de mortalité et le taux de transfection après 24 H. Les résultats sont représentés dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Tableau reprenant les taux de mortalité et de transfection pour les différentes conditions testées 24 H après la transfection des THP-1.

| Densités cellulaires | Quantité d'ADN utilisée : | Taux de mortalité : | Taux de transfection : |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------|
| 0,5.10⁶ cellules | 1 µg d'ADN | 50 % | 3 % |
| | 2,5 µg d'ADN | 40 % | 10 % |
| | 5 µg d'ADN | 60 % | 12 % |
| 1.10⁶ cellules | 1 µg d'ADN | 10 % | 7,5 % |
| | 2,5 µg d'ADN | 30 % | 8 % |
| | 5 µg d'ADN | 40 % | 12 % |

Le taux de transfection le plus élevé obtenu, 12 % correspond aux conditions 5 µg d'ADN / 0,5.10⁶ cellules et 5 µg d'ADN / 1.10⁶ cellules. Mais, la condition 5 µg d'ADN / 0,5. 10⁶ cellules entraîne un taux de mortalité fort élevé : jusqu'à 60 % de cellules mortes.

On remarque bien qu'au plus la concentration d'ADN à transférer augmente, au plus la mortalité cellulaire est importante (voir tableau 3.7). En ce qui concerne les densités cellulaires, la densité de 1. 10⁶ cellules donne un taux de mortalité plus faible que pour 0,5.10⁶ cellules. C'est, effectivement, la densité qui est conseillée par la société Amaxa.

Les conditions qui nous semblent les plus intéressantes sont donc 5 µg d'ADN et 1.10⁶ cellules. Le taux de transfection est de 12 % avec un taux de mortalité (40 %) qui n'est pas trop élevé.

3. Discussion :

Il est important de signaler que les THP-1 sont des cellules difficiles à transférer. Une des difficultés est qu'il est impossible de séparer les cellules mortes des cellules vivantes puisque les THP-1 sont des cellules en suspension. Si, par exemple, nous avons un taux de mortalité de 50 % et un taux de transfection de 10 %, nous avons en réalité 20 % de cellules vivantes qui sont transférées.

Avant de tester le Nucleofector, Sofia Dos Santos avait testé le Superfect sur les THP-1. Les activités β-galactosidase étaient acceptables, mais l'efficacité de transfection n'était que de 1 %, ce qui est très faible. Dans les expériences avec le Nucleofector, nous atteignons déjà un taux de transfection de plus de 10 %. Il reste encore des mises au point à effectuer. On peut donc espérer arriver à des taux de transfection de l'ordre de 20 %, ce qui serait tout à fait confortable pour les études avec des gènes rapporteurs.

| | |
|---|-----------|
| <u>INTRODUCTION :</u> | 1 |
| I. INTRODUCTION GENERALE : | 1 |
| II. L'ATHEROSCLEROSE : | 1 |
| 1. STRUCTURE D'UNE ARTERE : | 1 |
| 2. FACTEURS DE RISQUE : | 2 |
| 3. HYPOTHESE DE LA REACTION A L'AGRESSION : | 3 |
| III. LES LIPOPROTEINES ET LEUR ROLE DANS L'ATHEROSCLEROSE : | 4 |
| 1. STRUCTURE DES LIPOPROTEINES : | 4 |
| 2. METABOLISME DES LIPOPROTEINES : | 4 |
| 3. ROLES DES LIPOPROTEINES DANS L'ATHEROSCLEROSE : | 5 |
| 4. LES RECEPTEURS DES LIPOPROTEINES : | 7 |
| a) Les récepteurs aux LDL natives : | 7 |
| b) Les récepteurs aux LDL modifiées : | 7 |
| IV. LES MONOCYTES-MACROPHAGES : | 8 |
| 1. DANS LE CONTEXTE DE L'ATHEROSCLEROSE : | 8 |
| 2. ACTIVATION PAR LE LPS : | 10 |
| V. L'ETUDE DES PROFILS D'EXPRESSION GENIQUE : | 12 |
| 1. NORTHERN BLOT : | 12 |
| 2. DIFFERENTIAL DISPLAY : | 12 |
| 3. LES MICRODAMIERS A ADN : | 13 |
| 4. LA PCR EN TEMPS REEL : | 14 |
| VI. OBJECTIFS DU MEMOIRE : | 15 |
| <u>MATERIELS ET METHODES :</u> | 17 |
| I. CULTURE CELLULAIRE : | 17 |
| 1) Matériels : | 17 |
| 2) Méthode : | 17 |
| II. EXTRACTION DE LIPOPROTEINES : | 18 |
| 1) Principe : | 18 |
| 2) Matériels : | 18 |
| 3) Méthode : | 18 |
| <u>Dosage des LDL :</u> | 19 |
| 1) Matériel : | 19 |
| 2) Méthode : | 19 |
| III. TEST DE CHEMOTACTISME : | 19 |
| 1) Principe : | 19 |
| 2) Matériels : | 20 |
| 3) Méthode : | 20 |
| IV. ETUDES D'EXPRESSION DE GENES : | 21 |
| 1. STIMULATION DES THP-1 : | 21 |
| 1) Principe : | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2) Matériels : | 21 |
| 3) Méthode : | 21 |
| 2. EXTRACTION D'ARNM : | 21 |
| 1) Principe : | 21 |
| 2) Matériels : | 22 |
| 3) Méthode : (selon les instructions du fournisseur) : | 22 |
| 3. TRANSCRIPTION INVERSE : | 23 |
| 1) Principe : | 23 |
| 2) Matériels : | 23 |
| 3) Méthode : | 24 |
| 4. DAMIERS A ADN : | 24 |
| 4.1 Hybridation des ADNc biotinylés : | |
| 1) Principe : | 24 |
| 2) Matériel : | 24 |
| 3) Méthode : | 24 |
| 4.2 Révélation des ADNc : | |
| 1) Principe : | 25 |
| 2) Matériels : | 25 |
| 3) Méthode : | 25 |
| 5. REAL-TIME PCR : | 26 |
| 1) Principe : | 26 |
| 2) Matériels : | 26 |
| 3) Méthode : | 26 |
| 1. Mise au point des concentrations d'amorces en Real-Time PCR : | 26 |
| 2. Comparaison des efficacités de PCR : | 27 |
| 3. Real -Time PCR : | 27 |
| 6. TRANSFECTION DES THP-1 PAR ELECTROPORATION : | 28 |
| 1) Principe : | 28 |
| 2) Matériels : | 28 |
| 3) Méthodes : | 28 |
| 1. Optimisation des programmes de nucléofection : | 28 |
| 2. Test de cytotoxicité : | 29 |
| 3. Optimisation de la transfection : | 29 |
| 4. Optimisation du programme U01 : | 29 |
| RESULTATS ET DISCUSSION : | 30 |
| I. EXTRACTION DES LDL ET BIOACTIVITE : | 30 |
| 1. EXTRACTION DES LDL : | 30 |
| 2. LE CHEMOTACTISME : | 31 |
| II. ÉTUDE DES PROFILS D'EXPRESSION GENIQUE SUR DAMIERS A ADN: | 32 |
| 1. LA STIMULATION DES CELLULES THP-1 : | 32 |
| 2. L'EXTRACTION D'ARNM ET LA TRANSCRIPTION INVERSE : | 32 |
| 3. PRESENTATION GENERALE DES DAMIERS A ADN UTILISES : | 34 |
| 3.1 Hybridation, Révélation et Quantification : | 34 |
| 3.2 Difficultés rencontrées : | 35 |
| 3.3 Résultats obtenus avec les différents damiers: | 36 |
| 3.3.1 Damier prototype : | 36 |
| 3.3.2 Le CD Généraliste : | 37 |
| 3.3.3 La GeneralChip : | 39 |
| 3.3.4 Discussion des résultats d'hybridation : | 44 |

| | |
|---|----|
| III. CONFIRMATION DES RESULTATS OBTENUS SUR DAMIERS AVEC LA PCR EN TEMPS REEL : | 50 |
| 1. RESULTATS : | 50 |
| 2. DISCUSSION : | 55 |
| IV. LA TRANSFECTION : | 55 |
| 1. INTRODUCTION : | 55 |
| 2. RESULTATS : | 55 |
| 3. DISCUSSION : | 59 |
| <u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES :</u> | 60 |
| <u>ANNEXES :</u> | 62 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE :</u> | 67 |

Bellis et Casellas, La puce à ADN : un multi-réacteur de pillasse, Médecine et sciences, 13, 11, 1317-1324, 1997

Bonnenfant et Cabanne (1986), Anatomie pathologique : Principes de pathologie générale, de pathologie spéciale et d'aetopathologie, (éd. Maloin S.A), chapitre 15 : L'appareil circulatoire, pages 722 à 728.

Cotran (1996), Pathologie : Bases morphologiques et physio-pathologiques des maladies, (éd.PICCIN), chapitre 4 : Les maladies génétiques, pages 154 à 156.

Cotran (2000), Anatomie pathologique : Bases morphologiques et physio-pathologiques des maladies, (éd.PICCIN), chapitre 12 : Les vaisseaux sanguins, pages 597 à 621.

Douxchamps C., « Etude comparative de LDL modifiées dans la partie lipidique et/ou protéique sur l'activation induite des monocytes/macrophages humains et murins, stimulés ou non. », mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques, FUNDP, 1996

Fruchard, "Les statines pour la prévention cardio-vasculaire", La presse Médicale, 31, 1428-1433, 2002.

Haber (1995), Molecular Cardiovascular Medicine, (éd. Scientific American), chapitre 2 : Arteriosclerosis, an overview, page 22 ; chapitre 3 : Lipoprotein receptors and athérosclérosis, pages 33 à 36.

Hoon Han *et al.*, « Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocyte », Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol., 18, 1983-1991, 1998

Hoon han *et al.*, « Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathmays involving peroxisome proliferator-activated receptory », J Clin Invest, 106, 6, 793-802, 2000

Hoon Han *et al.*, « Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor inhibit monocyte CCR2 expression stimulated by plasma lipoproteins », Trends Cardiovasc Med, 10, 5, 209-216, 2000

Hyo Kyun *et al.*, "Statin inhibits interferon- γ -induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells", Experimental and Molecular Medecine, 34, 6, 451-461, 2002.

Li et Glass, « The macrophage foam cell as target for thérapeutique intervention », Nature, 8, 11, 1235-1248, 2002.

Libry, « Les maladies cardiovasculaires », Pour la science, 296, 60-67, 2002

Majno (1994), Cells, Tissues and Disease : Principles of general pathology, (éd.blackwell science), chapitre 3 : Symptoms of cellular disease, pages 85 à 90 ; chapitre 9 : Inflammation, pages 325 à 327.

Prost, Moatti *et al.*, « Rôle de l'interaction monocytes-cellules endothéliales dans la formation, le développement et les complications de la plaque d'athérome », Revue Française des Laboratoires, 328, 69-72, 2000

Rubin et Farber (1999), Pathology, (éd.Lippincot Raven), chapitre 10 : Blood vessels, pages 491 à 508.

Steinberg, « Atherogenesis in perspective : Hypercholesterolemia inflammation as partners in crimes », Nature, 8, 11,1211-1217, 2002.

Stevens et Lowe (1997), Anatomie pathologique générale et spéciale, (éd.De Boeck), chapitre 8 : Maladies de l'appareil circulatoire, pages 129 à 134.

Sirich (1996), Cellular and molecular pathogenesis, (éd.Lippincot Raven), pages 134 à 148.

Wang, Siow *et al.*, « Homocysteine induces monocytes chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kB in THP-1 macrophages », Am J Physiol Heart Circ Physiol, 280, 2840-2847, 2001

Woolf, « Pathology-Basic and Systemic », Ltd, W.S.C.,1998

Sites internet : www.feseb.org/opar/endothelium/endothelium.html
www.esculape.com/cardiologie/homocysteine.html